



# Inflammation du tissu adipeux au cours de l'obésité humaine : implication des lymphocytes Th17

Charles Caër

## ► To cite this version:

Charles Caër. Inflammation du tissu adipeux au cours de l'obésité humaine : implication des lymphocytes Th17. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066105 . tel-01390654

**HAL Id: tel-01390654**

**<https://theses.hal.science/tel-01390654>**

Submitted on 2 Nov 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**THESE DE DOCTORAT  
DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité  
Physiologie & Physiopathologie

Présentée par  
**Charles Caër**

Pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Sujet de la thèse :

**Inflammation du tissu adipeux au cours de l'obésité humaine :  
Implication des lymphocytes Th17**

Soutenue publiquement le 30 juin 2016

Devant le jury composé de :

Pr. Julien Fellah

Pr. Xavier Coumoul

Dr. Mireille Cormont

Dr. Claire Lagathu

Dr. Michèle Guerre-Millo

Dr. Sébastien André

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directrice de thèse

Co-encadrant de thèse





**THESE DE DOCTORAT  
DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité  
Physiologie & Physiopathologie

Présentée par  
**Charles Caër**

Pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Sujet de la thèse :

**Inflammation du tissu adipeux au cours de l'obésité humaine :  
Implication des lymphocytes Th17**

Soutenue publiquement le 30 juin 2016

Devant le jury composé de :

Pr. Julien Fellah

Pr. Xavier Coumoul

Dr. Mireille Cormont

Dr. Claire Lagathu

Dr. Michèle Guerre-Millo

Dr. Sébastien André

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directrice de thèse

Co-encadrant de thèse



## Remerciements

Ce manuscrit est l'aboutissement de mes travaux de recherche réalisés au sein de l'équipe 6 de l'Unité INSERM 1166 ICAN dirigée par le Pr Karine Clément que je remercie sincèrement pour m'avoir accordé sa confiance en m'accueillant dans son équipe et permis de faire cette thèse dans les meilleures conditions possibles.

Mes remerciements vont ensuite bien entendu à ma directrice de thèse, le Dr Michèle Guerre-Millo, et à mon co-encadrant, le Dr Sébastien André sans qui ce projet n'aurait pas vu le jour. Je tiens à remercier Sébastien pour m'avoir initié aux manipulations expérimentales, accompagné dans l'aboutissement du projet et transmis des nombreuses notions en immunologie ; bon courage pour l'obtention de ton HDR. J'exprime ma profonde reconnaissance à Michèle qui a grandement contribué à la réussite de ma thèse et qui m'a épaulé jusqu'à la dernière minute même dans les moments difficiles. Merci beaucoup et reposez vous bien (plus besoin de rester tous les soirs jusqu'à 22 heures).

J'adresse toute ma gratitude au Pr Julien Fellah pour avoir accepté de présider mon jury de thèse à la dernière minute ainsi qu'au Dr Mireille Cormont et au Pr Xavier Coumoul pour l'analyse de mon manuscrit « brouillon », leurs corrections et leurs conseils. Je tiens également à remercier le Dr Claire Lagathu pour sa participation à mon jury de thèse.

Je remercie très fortement Christine Rouault pour son aide, ses conseils et sa présence tout au long de ma thèse. Toutes mes félicitations pour l'obtention de ton poste d'Ingénieur de Recherche, tu le mérites amplement.

Je souhaite également remercier chaleureusement l'ensemble des membres de l'équipe Nutriomique, notamment Elise et tous les anciens (Maria, Jean-Charles, Omran, Vanessa,...), mes partenaires de doctorat, Sothéa et Hedi (bon courage à vous), Sophie et Julie (félicitations et bonne route), et les « nouveaux », Florian, Tiphaine, Emelyne, Jean, Marc, Karen, sans qui la fin de ma thèse aurait été plus difficile et monotone. Je remercie aussi Houda pour m'avoir remotivé durant son passage au sein de l'équipe, Geneviève pour tous ses conseils scientifiques, Arnaud pour sa bonne humeur et ses blagues (pas forcément réussites), Flavien, Tuong, Estelle, Magalie, Valentine, Laurent, Judith, Fabrizio, Isabelle, Joan, Danièle, et tous les autres. Je tiens évidemment à remercier tous les chirurgiens, médecins, techniciens et patients impliqués dans ce projet de thèse.

Enfin ce manuscrit n'aurait jamais pu voir le jour sans le soutien inconditionnel de mon amour, Anouk, merci pour tout. J'ai également une pensée particulière pour mes parents et mon frère, ainsi que pour l'ensemble de mes proches, qui ont cru en moi et ont toujours été présents.



# **Table des matières**

Liste des figures et des tableaux .....	11
Liste des abréviations .....	13
Contexte .....	15
Introduction .....	19
I. L'obésité : une pandémie .....	19
I.A. Définition .....	19
I.B. Epidémiologie .....	20
I.C. Origines multifactorielles .....	22
I.D. Conséquences .....	24
I.E. Prévention et traitements .....	26
I.E.1. Prévention .....	26
I.E.2. La restriction calorique .....	27
I.E.3. Les médicaments « anti-obésité » .....	27
I.E.4. La chirurgie bariatrique .....	28
II. Le tissu adipeux blanc : organe cible de l'obésité et contributeur majeur de l'inflammation chronique .....	31
II.A. Définition, répartition et composition .....	31
II.B. Les adipocytes .....	33
II.B.1. Fonctions métaboliques .....	33
II.B.1.a. La lipogenèse et la synthèse des triglycérides .....	33
II.B.1.b. La lipolyse .....	34
II.B.2. Fonctions sécrétrice et endocrinienne .....	36
II.B.2.a. La leptine .....	36
II.B.2.b. L'adiponectine .....	36
II.B.2.c. Les autres adipokines .....	37
II.C. La fraction stroma-vasculaire .....	39
II.C.1. Les pré-adipocytes et l'adipogenèse .....	40
II.C.2. Les cellules endothéliales et l'angiogenèse .....	41
II.D. Inflammation du tissu adipeux .....	45
II.D.1. Définition de l'inflammation chronique de bas grade .....	45
II.D.2. Facteurs déclencheurs de l'inflammation au cours de l'obésité .....	46
II.D.2.a. Acides gras, stress du réticulum endoplasmique et stress oxydant .....	46
II.D.2.b. Hypertrophie et hypoxie adipocytaires .....	47
II.D.4.c. Microbiote intestinal, LPS et TLR .....	49
II.D.3. Conséquences locales de l'inflammation chronique .....	53



II.D.3.a. La résistance à l'insuline et les voies inflammatoires .....	53
II.D.3.b. La fibrose du tissu adipeux .....	56
II.D.3.c. Les chimiokines du tissu adipeux .....	59
III. Cellules immunitaires du tissu adipeux .....	61
III.A. Les cellules de l'immunité innée .....	61
III.A.1. Les macrophages .....	61
III.A.1.a. Accumulation macrophagique dans le tissu adipeux obèse .....	61
III.A.1.b. Mécanismes d'accumulation macrophagique .....	62
III.A.1.c. Polarisation pro-inflammatoire dans le tissu adipeux obèse .....	63
III.A.1.d. Les macrophages après perte de poids .....	65
III.A.2. Les cellules dendritiques .....	66
III.A.3. Les granulocytes .....	67
IV.A.3.a. Les éosinophiles .....	68
III.A.3.b. Les neutrophiles .....	69
III.A.4. Les mastocytes .....	70
III.A.5. Les cellules lymphoïdes innées .....	70
IV.A.5.a. Les cellules ILC2 .....	71
III.A.5.b. Les cellules NK .....	71
III.B. Les lymphocytes T entre immunité innée et immunité adaptative .....	73
III.B.1. Les lymphocytes NKT .....	73
III.B.2. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ .....	73
III.B.3. Les cellules MAIT .....	74
III.C. Les cellules de l'immunité adaptative .....	75
III.C.1. Les lymphocytes B .....	75
III.C.2. Les lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> .....	76
III.C.3. Les lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> .....	77
III.C.3.a. Activation et polarisation des sous-populations de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> .....	77
III.C.3.b. Les lymphocytes Th2 .....	80
III.C.3.c. Les lymphocytes T régulateurs .....	80
III.C.3.d. Les lymphocytes Th1 .....	82
III.C.3.e. Les lymphocytes Th17 .....	83
Résultats .....	91
Projet de recherche .....	91
I. Article 1 : Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des lymphocytes T et des macrophages du tissu adipeux : « dialogue » immunitaire pro-inflammatoire au cours de l'obésité .....	93
II. Etude complémentaire : Rôle du microenvironnement du tissu adipeux sur l'activation des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> mémoires centraux .....	95

III. Article 2 : Impact des cytokines IL-17 et IL-1 $\beta$ sur les cellules non-immunitaires du tissu adipeux .....	103
Résultats complémentaires .....	128
Discussion et conclusion .....	137
Discussion et perspectives .....	137
1) Composition et « dialogue » immunitaire .....	137
2) Microenvironnement « pro-Th17 » du tissu adipeux obèse .....	138
3) Impact des cytokines IL-17 et IL-1 $\beta$ sur les cellules non-immunitaires du tissu adipeux .....	139
Conclusion .....	145
Références bibliographiques .....	147
Références bibliographiques .....	149



## Liste des figures et des tableaux

### Figures

Figure 1 : Pourcentage d'individus obèses dans le monde en 2013 .....	21
Figure 2 : Evolution du pourcentage d'individus obèses en France entre 1997 et 2012 .....	21
Figure 3 : Déséquilibre de la balance énergétique et autres facteurs favorisant l'obésité .....	22
Figure 4 : Comorbidités associées à l'obésité .....	24
Figure 5 : Effets sur la perte de poids et l'amélioration des comorbidités des trois principaux types de chirurgie bariatrique .....	30
Figure 6 : Processus physiologiques et métaboliques du tissu adipeux blanc impliquant la sécrétion d'adipokines .....	31
Figure 7 : Dépôts de tissu adipeux blanc chez l'humain .....	32
Figure 8 : Mécanismes et régulation de la lipogenèse et de la lipolyse adipocytaire .....	35
Figure 9 : Représentation approximative de la composition du tissu adipeux .....	39
Figure 10 : Principaux régulateurs de l'adipogenèse.....	41
Figure 11 : Mécanismes de l'angiogenèse du tissu adipeux.....	44
Figure 12 : Hypertrophie et hypoxie adipocytaires au cours de l'obésité .....	49
Figure 13 : Processus physiopathologiques de l'axe intestin-tissu adipeux .....	52
Figure 14 : Voies d'activation de l'inflammation et de la résistance à l'insuline .....	55
Figure 15 : Deux théories sur les étapes séquentielles menant à la fibrose du tissu adipeux obèse .....	58
Figure 16 : Acteurs cellulaires et chimiokines impliqués dans le recrutement de cellules immunitaires dans le tissu adipeux au cours de l'obésité.....	60
Figure 17 : Conditions de polarisation des macrophages anti-inflammatoires de type M2 et pro-inflammatoire de type M1 .....	65
Figure 18 : Les trois signaux nécessaires à l'activation et la différenciation de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> auxiliaires, ici exemple Th1 et Th2 .....	78
Figure 19 : Différenciations et fonctions immunes des principales sous-populations de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> auxiliaires .....	79
Figure 20 : Polarisation des Th17 chez la souris et chez l'humain .....	84
Figure 21 : Régulation de l'inflammation et la sensibilité à l'insuline par les cellules immunitaires innées et adaptatives du tissu adipeux et dérégulation au cours de l'obésité .....	86
Figure 22 : Boucle pro-inflammatoire entre les lymphocytes Th17 et les macrophages du tissu adipeux obès.....	94
Figure 23 : Rôle du microenvironnement du tissu adipeux sur l'activation des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> mémoires centraux .....	96
Figure 24: Inflammation « collective » du tissu adipeux viscéral obèse .....	99
Figure 25 : Activation des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> mémoires centraux en Th17 spécifiquement en présence d'explants de tissu adipeux viscéral obèse .....	100
Figure 26 : Corrélation entre l'inflammation du tissu adipeux et l'activation de type Th17 .....	101
Figure 27 : Corrélation entre la sécrétion et l'expression génique dans les adipocytes matures.....	128
Figure 28 : Doses réponses d'IL-17 et d'IL-1 $\beta$ dans des adipocytes matures.....	129
Figure 29 : Cinétique d'expression génique d'adipocytes matures « contrôles » .....	130
Figure 30 : Impact inflammatoire de différentes cytokines sur des adipocytes matures.....	131
Figure 31 : Impact métabolique de différentes cytokines sur des adipocytes matures.....	132
Figure 32 : Cinétique d'expression génique inflammatoire d'adipocytes matures traités avec des cytokines.....	133
Figure 33 : Cinétique d'expression génique métabolique d'adipocytes matures traités avec des cytokines.....	134

Figure 34 : « Dialogue » paracrine inflammatoire entre les cellules immunitaires et non-immunitaires du tissu adipeux humain : importance des Th17 et rôle majeur de l'IL-1 $\beta$ ..... 145

## Tableaux

Tableau 1 : Classification de poids, IMC et niveau de risque de morbidité associé .....	19
Tableau 2 : Caractéristiques des trois principaux types de chirurgie bariatrique .....	29
Tableau 3 : Fonctions, origines cellulaires et régulation au cours de l'obésité des principales adipokines.....	38
Tableau 4 : Résumé de l'implication des différentes populations immunitaires dans l'inflammation et la résistance à l'insuline du tissu adipeux au cours de l'obésité.....	88
Tableau 5 : Inflammation du tissu adipeux viscéral obèse .....	98
Tableau 6 : Impacts de l'IL-1 $\beta$ , l'IL-17 et l'IL-22 sur différents modèles d'adipocytes matures en culture.....	142

## Liste des abréviations

AGNE : acide gras non estérifié  
AGS : acide gras saturé  
ATGL : triglycéride lipase du tissu adipeux  
CCL : ligand de chimiokine  
CLSs : structures en forme de couronne  
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité  
COL : collagène  
CPA : cellule présentatrice d'antigène  
CRP : protéine C réactive  
CSM : cellule souche mésenchymateuse  
CTGF : facteur de croissance du tissu conjonctif  
CXCL : ligand de chimiokine motif C-X-C  
DC : cellule dendritique  
DT2 : diabète de type 2  
ECBM : milieu basal des cellules endothéliales  
ELISA : dosage immuno-enzymatique  
FACS : tri cellulaire activé par fluorescence  
FABP : protéine de liaison aux acides gras  
FAS : acide gras synthase  
FATPs : protéines de transport des acides gras  
FG : facteur de croissance  
FoxP3 : forkhead box P3  
FSV : fraction stroma-vasculaire  
G3P : glycérol-3-phosphate  
GLUT4 : protéine de transport du glucose de type 4  
HbA1c : hémoglobine glyquée  
HFD : régime gras  
HSL : lipase hormonosensible  
IFN : interféron  
IHC : immunohistochimie  
IL : interleukine  
IMC : indice de poids corporel

IR : insulino-résistant

LB : lymphocytes B

LPL : lipoprotéine lipase

LPS : lipopolysaccharide

LT : lymphocytes T

M1 : macrophage pro-inflammatoire

M2 : macrophage anti-inflammatoire

MCP : protéine chimioattractante de monocytes

MEC : matrice extracellulaire

MMP : métalloprotéinase matricielle

NF- $\kappa$ B : facteur nucléaire kappa B

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAI-1 : inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1

PAMPs : motifs moléculaires associés aux pathogènes

PPAR : récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes

RE : réticulum endoplasmique

SMet : syndrome métabolique

TA : tissu adipeux

TCR : récepteur des cellules T

TG : triglycérides

TGF- $\beta$  : facteur de croissance de transformation  $\beta$

Th : lymphocyte T auxiliaire

TIMP : inhibiteur tissulaire de la métalloprotéinase

TLR : récepteur de type Toll

TNF- $\alpha$  : facteur de nécrose tumorale  $\alpha$

Treg : lymphocyte T régulateur

TZD : thiazolidinediones

VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

VLDL : lipoprotéine de très basse densité

## Contexte

En l'absence d'infection ou de processus auto-immun, un état inflammatoire chronique de bas de grade se développe chez le sujet obèse et joue un rôle important dans les comorbidités associées à l'obésité, telles que les maladies hépatiques non alcooliques, l'insulinorésistance, le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires. Le tissu adipeux est en grande partie responsable de cet état *via* la production de biomolécules pro-inflammatoires. Alors que les travaux initiaux ont souligné l'importance des macrophages dans l'inflammation tissulaire, des études récentes démontrent des altérations de la composition des sous-populations de lymphocytes T jouant également un rôle dans ce phénomène pathologique. Cependant, chez l'humain, les données expérimentales concernant les lymphocytes T du tissu adipeux restent parcellaires. Les mécanismes permettant le recrutement et l'activation de ces cellules au cours de l'obésité ainsi que leurs rôles dans le tissu adipeux sont largement incompris.

L'objectif de cette thèse est d'analyser l'implication des lymphocytes T dans la pathologie du tissu adipeux induite par l'obésité et ses conséquences locales. Des travaux chez la souris ont révélé un rôle homéostatique de certaines sous-populations de lymphocytes T dans le tissu adipeux chez l'animal mince, mais également une accumulation des lymphocytes T pro-inflammatoires chez l'animal obèse. Sur la base de ces observations, nous émettons l'hypothèse qu'au cours de l'obésité, le profil anti-inflammatoire des lymphocytes T du tissu adipeux dérive vers un profil pro-inflammatoire, contribuant ainsi à l'inflammation chronique et à des altérations fonctionnelles des cellules du tissu adipeux.

Les objectifs spécifiques visent à :

I. Comparer les populations de lymphocytes T et de macrophages dans le tissu adipeux de patients minces, obèses et obèses diabétiques, et caractériser le « dialogue » paracrine cytokinique pro-inflammatoire entre ces deux types cellulaires au cours de l'obésité.

II. Etudier l'impact des cytokines liées à ce « dialogue » paracrine pro-inflammatoire sur les cellules non-immunitaires du tissu adipeux, en particulier sur les pré-adipocytes, les cellules endothéliales et les adipocytes matures, en se focalisant sur leurs réponses inflammatoires et métaboliques.

Nous privilégions une approche chez l'humain, intégrant des études cliniques, tissulaires et cellulaires grâce aux bioressources obtenues chez des individus obèses participant à un programme de chirurgie gastrique ainsi qu'à du tissu adipeux d'individus minces subissant une liposuction.





# Introduction



# Introduction

## I. L'obésité : une pandémie

### I.A. Définition

D'un point de vue médical, l'obésité est l'état d'un individu ayant un excès de poids dû à une accumulation anormale ou excessive de masse grasse pouvant entraîner des inconvénients pour sa santé et réduire son espérance de vie. Ainsi, l'obésité humaine a été reconnue comme une « maladie chronique » en 1997 par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Aux États-Unis l'obésité fut même reconnue comme maladie dès 1985 par deux grands Instituts Nationaux.

Comme on ne peut pas uniquement se fier au poids d'une personne pour déterminer si elle est en surpoids ou obèse, différents outils de mesure sont utilisés afin de fournir des renseignements complémentaires et prédire plus précisément l'impact de l'excès de poids sur la santé. L'outil le plus couramment utilisé est l'indice de masse corporelle (IMC). Cet indice se calcule en divisant le poids (kg) par la taille au carré (m<sup>2</sup>). Le « poids santé » correspond à un IMC entre 18,5 et 24,9 kg/m<sup>2</sup>. Ensuite on parle de surcharge pondérale ou de surpoids lorsque l'IMC se situe entre 25 et 29,9 kg/m<sup>2</sup>. Et finalement d'obésité lorsque l'IMC est  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>, avec différents stades d'obésité en fonction de l'IMC et du risque de morbidité (**Tableau 1**). En effet, l'obésité morbide (IMC  $\geq 40$  kg/m<sup>2</sup>) ferait perdre 8 à 10 années d'espérance de vie (Prospective Studies Collaboration et al., 2009).

Classification		IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Risque de morbidité
Maigreur	extrême	$\leq 15,9$	élevé
	faible	16 à 18,4	accru
Poids « normal »		18,5 à 24,9	faible
Surpoids		25 à 29,9	accru
Obésité	classe I, modérée	30 à 34,9	élevé
	classe II, sévère	35 à 39,9	très élevé
	classe III, morbide	$\geq 40$	extrêmement élevé

**Tableau 1 : Classification de poids, IMC et niveau de risque de morbidité associé**

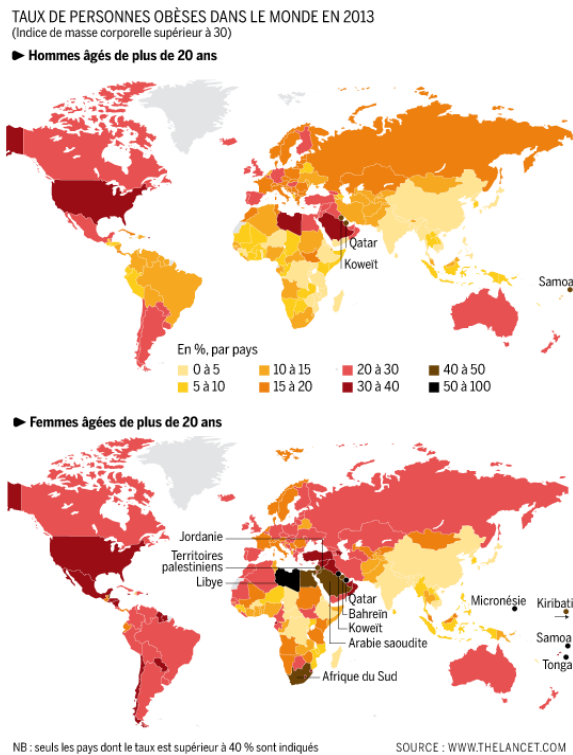
Cependant, cet outil de mesure ne permet pas de faire la distinction entre les masses osseuse, musculaire et adipeuse qui varient considérablement d'un individu à l'autre. De plus, l'IMC ne donne aucune information sur la répartition de la masse grasseuse, qui peut se répartir de deux manières différentes. Au niveau des hanches, des cuisses et en périphérie, on parle alors d'obésité gynoïde, périphérique, ou sous-cutanée ; ce type d'obésité est principalement présent chez les femmes. Ou bien dans la région abdominale, on parle alors d'obésité androïde, abdominale ou viscérale ; ce type d'obésité est principalement présent chez les hommes (Ley et al., 1992; Vague, 1947). Or, il est maintenant bien établi que les individus atteints d'obésité androïde ont un risque de morbidité plus élevé que ceux atteints d'obésité gynoïde (Balkau et al., 2007; Després, 2012; Després and Lemieux, 2006; Rexrode et al., 1998; Sam et al., 2009).

Il existe également d'autres types de mesures comme le tour de taille qui permet de détecter plus précisément un excès d'adiposité au niveau de l'abdomen, ou le rapport « tour de taille/tour de hanches » pour avoir une meilleure idée de la répartition de la masse grasse corporelle. Cependant ces mesures sont seulement utilisées en complément de l'IMC. Ainsi, des chercheurs tentent de mettre au point de nouveaux outils de mesure de l'excès de masse grasse. En 2011, l'indice de masse adipeuse (IMA) a été étudié et publié mais n'est pas utilisé en médecine courante (Bergman et al., 2011). Plus récemment, une équipe a développé et publié un nouvel indice, le Surface-based Body Shape Index (SBSI), basé sur quatre mesures principales : la surface corporelle, la circonférence du tronc vertical, la taille et le tour de taille. Or, ce nouvel indice est plus performant que l'IMC afin de prédire la mortalité associée à l'obésité (Rahman and Adjero, 2015). Cependant, jusqu'à présent, la simplicité de l'utilisation de l'IMC en fait le principal outil prédictif dans les études médicales sur l'obésité.

## **I.B. Epidémiologie**

L'obésité est aujourd'hui considérée comme une pandémie. En effet, l'OMS en fait un problème de santé publique à l'échelle mondiale car l'épidémie d'obésité se poursuit sans relâche dans les pays occidentaux et augmente de façon plus spectaculaire dans le reste du monde, paradoxalement même dans les pays où la pauvreté et la malnutrition sont très répandues. De façon dramatique, les taux d'obésité sont en augmentation, non seulement dans les populations adultes, mais aussi chez les enfants. En effet l'augmentation du poids moyen s'observe dans toutes les tranches d'âge et dans tous les groupes socio-économiques.

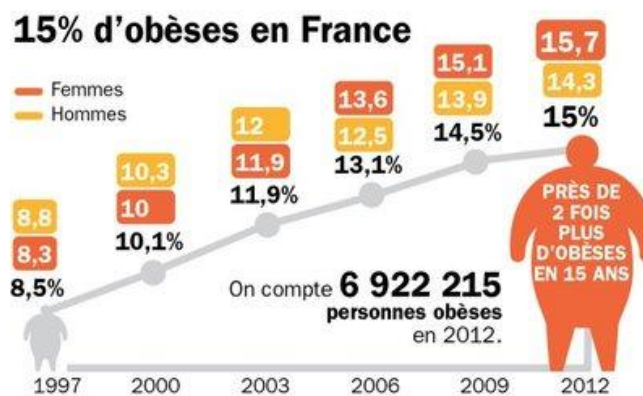
A l'échelle mondiale, la prévalence de l'obésité a plus que doublé durant ces 30 dernières années. Ainsi en 2013, il y avait environ 26 % d'adultes (> 20 ans) en surpoids et 13 % d'adultes obèses (**Figure 1**). De plus, en 2013, l'OMS dénombrait environ 40 millions d'enfants de moins de 5 ans en surpoids ou obèses.



**Figure 1 : Pourcentage d'individus obèses dans le monde en 2013**

(D'après : The Lancet.com)

Par exemple, en France, en 2012, il y avait environ 17 % d'adultes (> 18 ans) en surpoids et 15 % d'adultes obèses (**Figure 2**). De plus, il y avait environ 15 % d'enfants (3-17 ans) en surpoids et 3,5 % d'enfants obèses. Toutefois, pour la première fois en plus de 30 ans, la progression de l'obésité ralentit enfin en France (ObEpi-Roche, 2012).

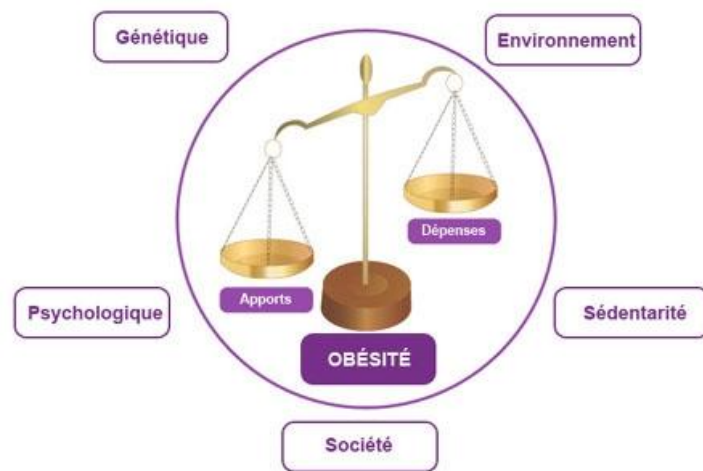


**Figure 2 : Evolution du pourcentage d'individus obèses en France entre 1997 et 2012**

(D'après : ObEpi-Roche 2012)

## I.C. Origines multifactorielles

L'obésité est due au stockage excessif de graisse dans le corps. Or, de nombreux facteurs sont impliqués dans cette maladie tels que la génétique, la sédentarité et l'environnement (Bell et al., 2005; Hill and Peters, 1998; Malik et al., 2013; McAllister et al., 2009; Mutch and Clément, 2006). Cependant, elle résulte principalement d'un déséquilibre de la balance énergétique, c'est-à-dire d'une dépense énergétique insuffisante par rapport à l'apport journalier en calories *via* l'alimentation, et ce de façon répétée et continue à long terme (Daniels et al., 2005; Hill et al., 2012; Malik et al., 2013; Mokdad et al., 2004) (**Figure 3**).



**Figure 3 : Déséquilibre de la balance énergétique et autres facteurs favorisant l'obésité**

Certains résultats suggèrent que les apports caloriques ne joueraient pas un rôle aussi important qu'on le pensait dans l'étiologie de l'obésité (Heini and Weinsier, 1997). Par conséquent, l'insuffisance des dépenses énergétiques quotidiennes serait prépondérante dans le déséquilibre de la balance énergétique liée à l'obésité.

En effet, les aliments consommés fournissent de l'énergie à l'organisme dont la dépense dépend de trois actions principales (Bergouignan and Blanc, 2006) :

- La dépense énergétique de repos : notre organisme consomme 60 % de la dépense énergétique quotidienne pour assurer la circulation du sang *via* l'activité cardiaque, la respiration, les fonctions gastro-intestinales et rénales ainsi que la thermorégulation de notre corps.
- La thermogenèse post-prandiale : 10 % de la dépense énergétique quotidienne représente le coût de la digestion, du transport et du stockage des nutriments.
- L'activité physique : qui utilise 30 % de la dépense énergétique quotidienne chez un individu « moyen ».

Mais laquelle de ces dépenses énergiques est réduite chez les individus souffrant d'obésité ?

Tout d'abord, plusieurs études ont montré que la dépense énergétique de repos n'est pas réduite au cours de l'obésité, que ce soit chez les Indiens Pima (Ravussin et al., 1988), chez des femmes post-obèses (Weinsier et al., 2002), ou en comparant des femmes américaines d'origines africaines et des femmes nigériennes (Luke et al., 2000).

Ensuite, il y a l'hypothèse selon laquelle une thermogenèse post-prandiale réduite contribuerait au développement de l'obésité. Cependant, une compilation des études de surnutrition estimant la thermogenèse post-prandiale sur 24 heures en relation avec la prise de poids indique que ce facteur joue un rôle mineur, voire aucun rôle, sur la dépense énergétique totale dans l'obésité (Schoeller, 2001).

Pour finir, il y a l'activité physique, qui constitue l'élément le plus variable de la dépense énergétique. Par exemple, le coût de l'activité physique peut représenter seulement 20 à 30 % de la dépense énergétique quotidienne chez un individu sédentaire contre 50 à 60 % chez un individu très actif. Plusieurs études ont analysé la relation entre le niveau d'activité physique, caractérisé par un index nommé PAL (Physical Activity Level), et leur adiposité, mais les résultats sont contradictoires (Ekelund et al., 2002; Hunter et al., 1997). En revanche, toutes les études épidémiologiques, prospectives et longitudinales ont montré le rôle clef de l'activité dans la prévention de la prise de poids, ce qui montre que les individus actifs présentent moins de risque de prise du poids que les individus sédentaires (Williamson et al., 1993).

Généralement, la prédisposition à l'obésité dépend de plusieurs gènes (obésité polygénique), en effet les formes d'obésité monogénique, dépendant d'un seul gène, sont environ de 5 %. Bien qu'il soit estimé que 40 à 70 % de la variabilité interindividuelle dans la prévalence de l'obésité est génétique (Bouchard and Pérusse, 1993), on considère trop souvent cette composante génétique comme causale dans l'étiologie de l'obésité, indépendamment de l'environnement. Or, une étude sur 136 jumeaux a montré que l'activité physique prévenait l'obésité quel que soit le degré de prédisposition génétique à être obèse (Samaras et al., 1999). Ainsi, selon Roland Wiensier, "our genes permit us to become obese, the environment determines if we become obese" (Weinsier et al., 1998).

L'évolution des habitudes en matière d'alimentation et d'exercice physique est souvent le résultat de changements environnementaux et sociétaux liés au progrès technologique ainsi qu'à un manque d'investissement dans des secteurs tels que la santé, l'agriculture, les transports, l'urbanisme, l'industrie agroalimentaire et surtout l'éducation (Malik et al., 2013).

Nous ne sommes donc pas identiques ou « égaux » face à l'obésité. Ainsi, accéder à une meilleure compréhension des causes et des mécanismes biologiques conduisant à l'obésité est aujourd'hui un des enjeux majeurs de la recherche. De plus, comme toutes les maladies chroniques, une fois

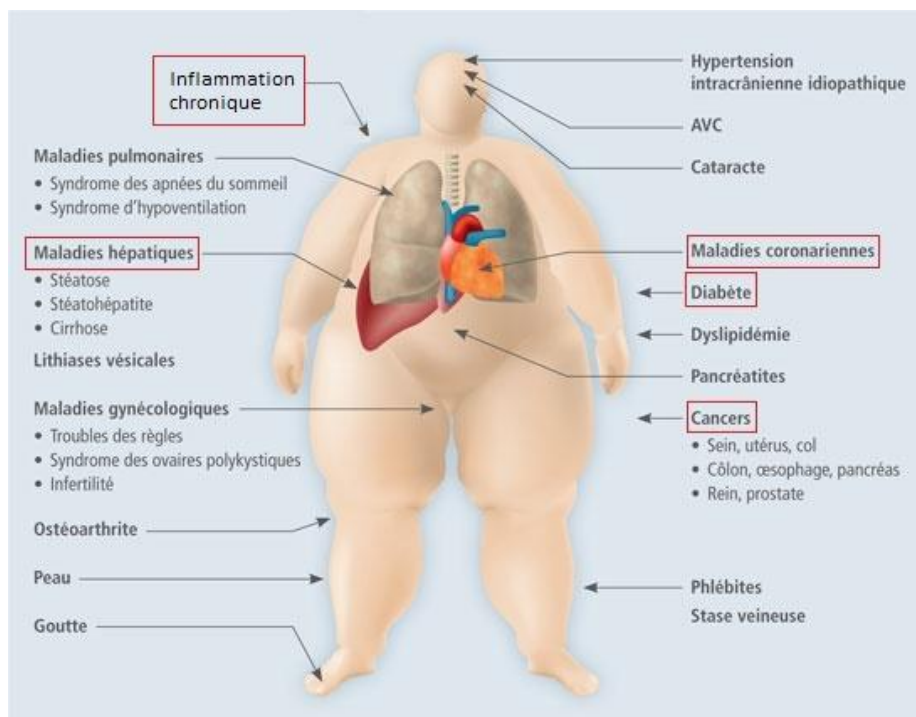


« installée » l'obésité est quasiment irréversible. La prévention de son développement est donc primordiale si l'on veut enrayer l'épidémie mondiale.

### I.D. Conséquences

L'obésité est une maladie chronique. Effectivement, les problèmes de santé commenceraient à se manifester après environ 10 ans d'excès de poids, en particulier chez les individus atteints d'obésité sévère ou morbide. Ainsi, de nombreuses études ont mis en évidence une étroite corrélation entre l'IMC et de multiples pathologies associées à une mortalité accrue (Berrington de Gonzalez et al., 2010).

L'obésité sévère ou morbide est un facteur très important de risque de maladies métaboliques et chroniques telles que les maladies hépatiques, la résistance à l'insuline, le diabète de type 2 (DT2), l'hypertension artérielle, l'athérosclérose, les maladies cardiovasculaires, et même plusieurs types de cancers (Guh et al., 2009; Mokdad et al., 2003; Prospective Studies Collaboration et al., 2009). Ces pathologies sont couramment appelées « comorbidités » associées à l'obésité (**Figure 4**).



**Figure 4 : Comorbidités associées à l'obésité**

Il existe aussi ce qu'on appelle le « syndrome métabolique » (SMet) qui est un regroupement de conséquences physiopathologiques dû à la surnutrition, au mode de vie sédentaire, et à l'excès d'adiposité en résultant. Le SMet regroupe l'obésité abdominale, la résistance à l'insuline, la

dyslipidémie, l'hypertension artérielle, et est associé à d'autres comorbidités, y compris l'état prothrombotique, l'inflammation chronique de bas grade et les maladies hépatiques non alcooliques (Cornier et al., 2008). Cependant, du fait de son hétérogénéité et qu'il n'est pas une maladie, le SMet peut avoir différentes définitions (Després et al., 2008).

- Les maladies cardiovasculaires associées à l'obésité sont principalement l'hypertension artérielle, l'insuffisance coronaire et cardiaque, les accidents vasculaires cérébraux, les thromboses veineuses et les embolies pulmonaires. Elles résultent généralement d'une dyslipidémie, et aboutissent à l'athérosclérose et ainsi aux infarctus du myocarde (Feingold and Grunfeld, 2000).

- De plus, l'obésité est associée à une forte augmentation de l'incidence des maladies hépatiques telles que la stéatose hépatique non alcoolique qui peut s'aggraver en cirrhose puis en cancer du foie (Lazo and Clark, 2008; López-Velázquez et al., 2014; Tilg and Moschen, 2010). Il existe aussi un risque accru de certains cancers digestifs et de l'appareil génital (Calle and Kaaks, 2004; Font-Burgada et al., 2016; van Kruijsdijk et al., 2009; Park et al., 2014).

- L'obésité est également associée à une forte augmentation de la prévalence du DT2 qui est caractérisé par une hyperglycémie chronique due à une insulino-résistance des tissus périphériques, une augmentation de la production hépatique du glucose (néoglucogenèse) combiné ou non à un défaut de la sécrétion d'insuline par le pancréas (Lillioja et al., 1993). Cette pathologie favorise elle-même de nombreuses maladies, notamment rénales, ophtalmiques et cardiovasculaires (Vijan, 2015).

- Finalement, l'inflammation chronique de bas grade systémique est considérée comme un facteur clé dans le développement de ces comorbidités (Danesh et al., 2000, 2004; Pradhan et al., 2001; Ridker, 2004).

Cependant, l'obésité est une maladie complexe et hétérogène, et pour un même IMC plusieurs facteurs peuvent influencer l'incidence de ces comorbidités, comme l'origine ethnique (Calle et al., 1999), ou la manière dont la graisse est répartie corporellement ainsi l'obésité androïde a plus d'incidence sur ces comorbidités que l'obésité gynoïde (Després, 2012).

En raison de toutes ces comorbidités, le surpoids et l'obésité auraient provoqué 3,4 millions de décès au cours de la seule année 2010 (Murray et al., 2012). En particulier le DT2 et les maladies cardiovasculaires entraînent le décès d'au moins 3 millions de personnes chaque année dans le monde selon l'OMS. Ainsi, les individus obèses ont une espérance de vie plus courte (Fontaine et al., 2003), mais également une moins bonne qualité de vie (Vita et al., 1998). D'ailleurs, on pense que les enfants d'aujourd'hui seront la première génération dont l'espérance de vie ne dépassera pas celle de leurs parents, principalement à cause des comorbidités associées à l'obésité (Adams et al., 2006; Olshansky et al., 2005).

L'obésité est également un fardeau psychologique et social. En effet, l'obésité peut entraîner des arrêts de travail pour raisons médicales, des difficultés à l'embauche, une moindre rémunération, un rejet et de la discrimination sociale chez l'adulte comme chez l'enfant (Brewis, 2014; Judge and Cable, 2011). L'obésité peut aussi engendrer des perturbations de l'image du corps, une mésestime de soi et des états dépressifs (Wardle and Cooke, 2005). Cependant, il a été montré que la pandémie de l'obésité peut aussi se propager à travers les liens sociaux (Christakis and Fowler, 2007).

Pour finir, l'obésité est aussi un problème économique majeur (Finkelstein et al., 2005). D'après une étude du McKinsey Global Institute (McKinsey & Company), le coût de l'obésité est estimé à 2 000 milliards de dollars par an à l'échelle mondiale (2,8 % du PIB mondial).

Ainsi, l'obésité est devenue un problème planétaire de santé publique pire que d'autres risques sanitaires majeurs, comme le tabac ou la malnutrition infantile. En effet, contrairement à ceux-ci, aucun pays n'a réussi à réduire son taux d'obésité au cours des trois dernières décennies.

## **I.E. Prévention et traitements**

### **I.E.1. Prévention**

Chez les adultes, comme chez les enfants, les changements alimentaires de ces dernières décennies sont étroitement liés avec l'épidémie d'obésité observée au niveau mondial, avec une disponibilité quasi sans limite d'aliments peu coûteux, à haute teneur en énergie, mais à faible valeur nutritionnelle (Birch, 2006). Or, l'environnement familial a une forte influence sur l'alimentation et la prise de poids (Birch, 1998; Birch and Davison, 2001; Birch and Fisher, 2000; Birch et al., 2003). Par exemple, les nourrissons américains consommeraient 120 % de leurs besoins énergétiques quotidiens (Devaney et al., 2004). Ainsi, la prévention de l'obésité commence dès l'alimentation infantile. Il faut également bien dormir (Chaput et al., 2006; Patel and Hu, 2008), gérer son stress (Moore and Cunningham, 2012; Torres and Nowson, 2007), éviter les régimes à répétitions (Montani et al., 2006), et bien sûr avoir une activité physique régulière (Irving et al., 2008; Ohkawara et al., 2007). Finalement avoir un mode de vie sain (American Heart Association Nutrition Committee et al., 2006), ce qui n'est pas facilité par notre environnement et le secteur agroalimentaire. Par exemple, au Royaume-Uni, une étude a montré que pour faire redescendre l'IMC à son niveau de 1980, il faudrait une réduction de 8 % de la consommation dans le pays, mais que cela coûterait environ 10,6 milliards par an à l'industrie alimentaire.

### **I.E.2. La restriction calorique**

En lien avec l'obésité, la proportion de personnes essayant de perdre du poids par restriction calorique a fortement augmentée au cours des dernières décennies. En effet, d'après des enquêtes nationales américaines menées entre 1950 et 1966, environ 14 % des femmes et 7 % des hommes ont déclaré qu'ils essayaient de perdre du poids. Or, dans le même type d'enquête menée au milieu des années 1990 aux États-Unis, impliquant plus de 100 000 adultes (> 18 ans), ce pourcentage était de 44 % chez les femmes et 29 % chez les hommes (Serdula et al., 1999). Cependant, seulement 35 % des personnes ont réussi à maintenir une perte de poids à long terme car la stratégie commune était de consommer moins de matières grasses, mais pas moins de calories, et seulement 20 % des personnes ont déclaré avoir utilisé la combinaison recommandée de manger moins de calories et de faire au moins 150 minutes d'activité physique par semaine (Serdula et al., 1999). Par exemple, après avoir analysé une trentaine d'études, des chercheurs ont observé une perte de poids durant les six premiers mois d'un régime, cependant, après 2 à 5 ans de régime, environ deux tiers des personnes revenaient à leur poids initial ou avaient même pris du poids (Mann et al., 2007). Ainsi, la reprise de poids concerne 80 % des individus après un an et ce chiffre augmente avec le temps (Anses, 2010). Or, l'effet « yo-yo » dû à des régimes inefficaces répétés augmente les risques de maladies cardiovasculaires et de mortalité, et ce indépendamment des maladies préexistantes (Lissner et al., 1991; Montani et al., 2006). Finalement, le maintien d'une perte de poids à long terme passe par un régime alimentaire faible en gras, une auto-surveillance fréquente de son poids corporel et de sa prise alimentaire, ainsi qu'une activité physique régulière (Wing and Hill, 2001). Il a également été souligné l'importance des stratégies d'accompagnement pour faire face aux adaptations hormonales dues à la perte de poids (Sumithran et al., 2011). Or, une perte de poids, même limitée (5 à 10% du poids), a un effet bénéfique sur les majorités des maladies liées à l'obésité et permet ainsi d'améliorer la santé des patients de façon notable (Magkos et al., 2016).

### **I.E.3. Les médicaments « anti-obésité »**

Tout d'abord il faut noter que les anciens médicaments dits « coupe-faim », comme les amphétamines (Heal et al., 1998) et la fenfluramine (Pinder et al., 1975) ne sont plus autorisés. Ils avaient trop d'effets secondaires, notamment des problèmes cardiovasculaires et d'hypertension (Fitzgerald et al., 2000; James et al., 2010). Ainsi, actuellement en France, un seul médicament pour le traitement de l'obésité est en vente sur prescription médicale : l'orlistat. La prescription concerne uniquement deux catégories de personnes, les obèses et les personnes avec un IMC  $\geq 28$  présentant une ou plusieurs complications métaboliques. Cependant le traitement par l'orlistat conduit généralement à une perte de poids modeste, en moyenne de 3 kg (Rucker et al., 2007). En dépit de la faible incidence sur l'IMC, il existe une réduction de 37 % de l'incidence du DT2 (Torgerson et al., 2004). Il existe également une amélioration de la pression artérielle et une diminution du taux sanguin de cholestérol (Rucker et al.,

2007). Ces trois facteurs vont dans le sens d'une diminution du risque de survenue de maladies cardiovasculaires même si cela n'a pas été démontré. Cependant, le taux d'abandon du traitement est important, seulement 10 % des patients poursuivent le traitement au-delà d'un an et 2 % au-delà de deux ans (Padwal et al., 2007). En ce qui concerne les traitements « naturels », il n'y a aucune preuve d'un effet amaigrissant particulier d'une plante ou d'un extrait de plantes dans les conditions d'utilisation courante.

#### **I.E.4. La chirurgie bariatrique**

Si la restriction calorique et l'orlistat ont un impact limité sur la perte de poids, la chirurgie de l'obésité connaît un développement important et des effets fulgurants. En effet, en 10 ans, entre 2003 et 2013, le nombre d'intervention a été multiplié par 3 dans les pays appartenant à la Fédération Internationale pour la Chirurgie de l'Obésité (IFSO), passant d'environ 150 000 à 470 000 au niveau mondial (Angrisani et al., 2015; Buchwald and Williams, 2004). A l'heure actuelle, 95 % des opérations mondiales (100 % en France) se font par cœlioscopie (ou laparoscopie) qui est une technique chirurgicale mini-invasive (Angrisani et al., 2015).

La chirurgie de l'obésité, nommée chirurgie bariatrique, est réservée aux personnes souffrant d'obésité morbide ou souffrant d'obésité et présentant une ou plusieurs complications métaboliques. En outre, elle est déconseillée pour les patients présentant des difficultés comportementales psychologiques ou sociales et interdite pour ceux ayant une maladie d'ordre psychologique (Hubbard and Hall, 1991).

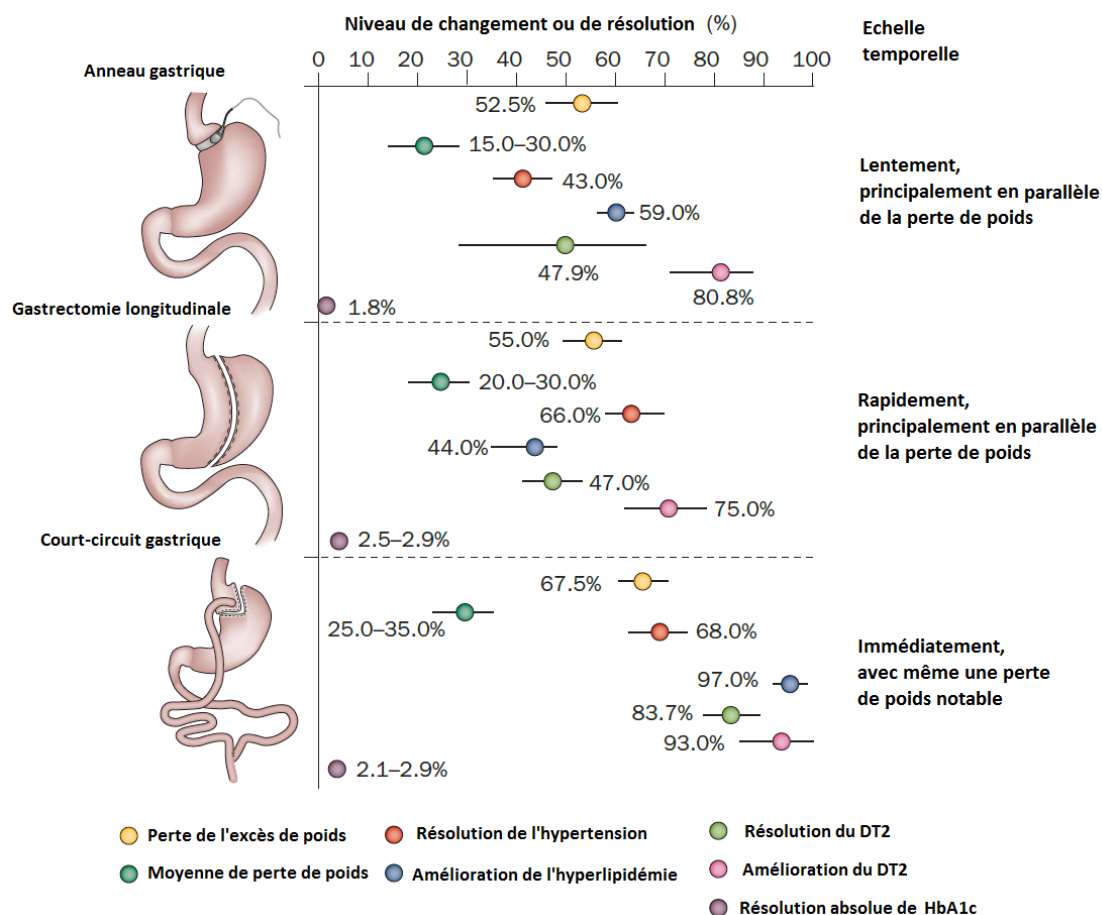
La chirurgie bariatrique consiste à restreindre l'absorption des aliments afin de réduire l'apport calorique journalier. Il existe 3 types majeurs d'interventions avec des caractéristiques bien distinctes : l'anneau gastrique, la gastrectomie longitudinale et le court-circuit gastrique (**Tableau 2**).

Caractéristiques	Anneau gastrique	Gastrectomie longitudinale	Court-circuit gastrique
% des interventions	Monde : 10 % France : 19 %	Monde : 37 % France : 48 %	Monde : 45 % France : 21 %
Durées	Intervention : 30-60 minutes Hospitalisation : 1 à 2 jours	Intervention : 1-2 heures Hospitalisation : 2-4 jours	Intervention : 2-4 heures Hospitalisation : 2-4 jours
Opérations	Pose d'un anneau autour de la jonction entre l'œsophage et l'estomac	Ablation des 2/3 de l'estomac	Réduction du volume de l'estomac et modification du circuit alimentaire
Mode d'actions	Restriction de l'absorption et sensation de satiété	Restriction de l'absorption et diminution du taux de ghréline	Restriction de l'absorption, malabsorption, diminution de la ghréline et syndrome de dumping
Perte de poids (à 2-3 ans)	45-50 % de l'excès de poids	60-70 % de l'excès de poids	70-80 % de l'excès de poids
Comorbidités	Diminution	Forte diminution	Très forte diminution
Complications opératoires	Saignements, infections, embolie pulmonaire, hernie hiatale et reflux gastro-œsophagien	Fistule, ulcères, sténose, hémorragies, reflux gastrique et dilatation de l'estomac	Fistule, ulcères, sténoses, hémorragies, carences nutritionnelles et hernie interne
Avantages	Hospitalisation courte et opération réversible	Confort alimentaire, meilleure perte de poids et amélioration métabolique	Confort alimentaire, meilleure perte de poids et amélioration métabolique
Inconvénients	Infection du boîtier, glissement et migration de l'anneau, reflux gastrique et œsophagite	Hospitalisation longue et opération non réversible	Forte carence alimentaire et opération pratiquement non réversible

**Tableau 2 : Caractéristiques des trois principaux types de chirurgie bariatrique**

L'efficacité de la chirurgie bariatrique sur la perte de poids est constante intrinsèquement pour chaque type d'intervention mais est plus efficace pour les techniques mixtes, qui associent restriction gastrique et malabsorption intestinale comme le court-circuit gastrique. Elle peut atteindre parfois 40 % du poids initial (Colquitt et al., 2005, 2014).

De plus, la chirurgie bariatrique diminue fortement les maladies cardiovasculaires et la mortalité des individus obèses opérés (Adams et al., 2007; Sjöström et al., 2007, 2012). Il y a également une amélioration de l'hypertension artérielle, du bilan lipidique et du DT2 préexistant dans plus de 75 % des cas (Buchwald et al., 2004, 2009). De plus, l'amélioration de la glycémie est très précoce, avant même toute perte de poids (Pories et al., 1995). Il a également été montré que la chirurgie bariatrique est supérieure aux traitements médicaux pour induire une rémission à court terme du DT2 et des comorbidités associées (Müller-Stich et al., 2015). En outre, la chirurgie bariatrique prévient aussi la survenue du DT2 (Carlsson et al., 2012). Pour finir, la récurrence de l'obésité a lieu dans moins d'un cas sur 10 sur le long terme (Sjöström et al., 2004). (**Figure 5**).



**Figure 5 : Effets sur la perte de poids et l'amélioration des comorbidités des trois principaux types de chirurgie bariatrique**

(D'après : (Frühbeck, 2015))

Finalement, la chirurgie bariatrique aide à perdre du poids durablement et peut également réduire de nombreuses comorbidités. Néanmoins, se faire opérer est une décision importante qui nécessite une bonne préparation puis un suivi régulier à vie. La réussite de l'opération passe aussi par le changement durable des habitudes alimentaires, la pratique régulière d'une activité physique, et la prise quotidienne à vie de compléments en vitamines, en minéraux et en oligoéléments (Bal et al., 2012).

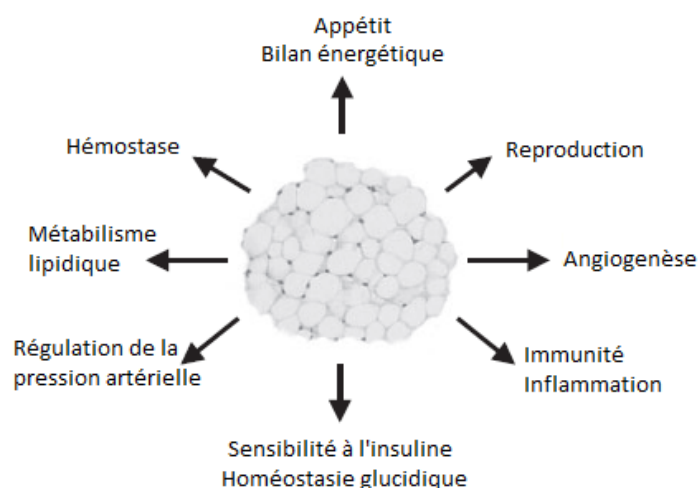
Finalement, l'obésité est une maladie complexe et très contraignante. Bien qu'un besoin fondamental pour une meilleure prévention de l'excès de poids soit universellement reconnu, les conséquences médicales, psychologiques et économiques de la pandémie d'obésité exigent l'application généralisée des traitements et des interventions efficaces. Même si à l'heure actuelle la chirurgie bariatrique permet d'avoir des résultats notables sur la perte de poids et la survie des individus obèses, il est nécessaire de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu dans l'obésité afin d'améliorer la prévention des complications métaboliques, les soins médicaux et d'adapter une stratégie thérapeutique à chaque individu. Or, l'organe cible de l'obésité est le tissu adipeux blanc.

## II. Le tissu adipeux blanc : organe cible de l'obésité et contributeur majeur de l'inflammation chronique

### II.A. Définition, répartition et composition

Le tissu adipeux (TA) est un tissu conjonctif lâche dont le rôle principal est de stocker de l'énergie sous forme de lipides, qui constituent environ 90 % du tissu, ce qui en fait la plus importante réserve énergétique de l'organisme. Cette réserve énergétique est utilisée par l'organisme lorsque les réserves glucidiques sont épuisées, par exemple durant un jeûne, un effort physique, ou en période de froid. De plus, il assure une isolation thermique et une protection autour des organes contre les chocs mécaniques.

Longtemps ignoré par les anatomistes et les médecins qui le considéraient comme un simple organe inerte servant uniquement au stockage lipidique, le TA a été de plus en plus étudié au cours des deux dernières décennies du fait de la découverte de son implication dans de nombreux processus métabolique et homéostatique. En effet, outre son rôle dans la régulation de la masse grasse, le TA est impliqué dans l'homéostasie alimentaire, la réponse immunitaire, le contrôle de la pression sanguine, l'hémostase, la régulation de la masse osseuse, ainsi que dans les fonctions thyroïdienne et de reproduction. Tous ces processus sont régulés par la synthèse et la libération de nombreuses hormones et cytokines nommées « adipokines ». Par exemple le TA peut fournir des informations au niveau cérébral pour contrôler la prise alimentaire, mais aussi produire de l'œstrogène et des molécules inflammatoires. Ainsi, le TA est un organe majeur du système endocrinien mais également de l'inflammation chronique associée à l'obésité (Kershaw and Flier, 2004; Trayhurn and Wood, 2004) (**Figure 6**).

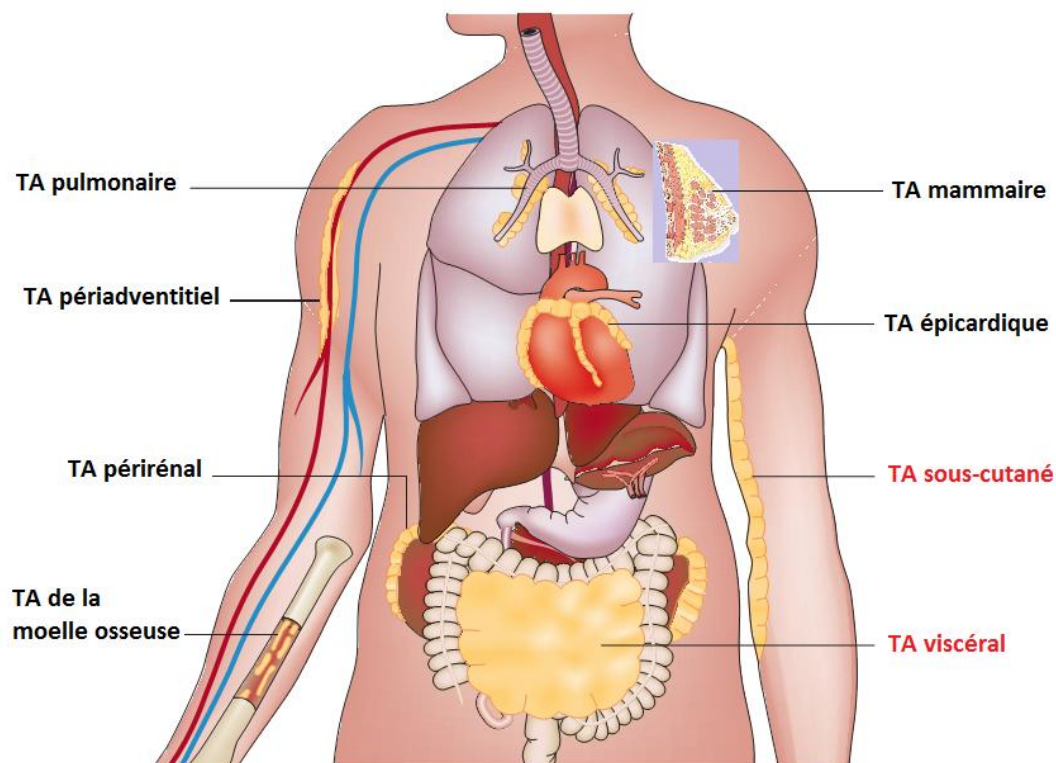


**Figure 6 : Processus physiologiques et métaboliques du tissu adipeux blanc impliquant la sécrétion d'adipokines**

(D'après : (Trayhurn and Wood, 2004))



Le TA représente 20 à 25 % de la masse corporelle chez la femme et 15 à 20 % chez l'homme. Il existe différents dépôts de TA, les deux principaux étant le TA sous-cutané et le TA viscéral (ou omental). Il y a aussi d'autres dépôts à travers le corps, généralement associés à des organes tels que le cœur, les reins, les poumons, les seins, et la moelle osseuse (**Figure 7**).



**Figure 7 : Dépôts de tissu adipeux blanc chez l'humain**

(D'après : (Ouchi et al., 2011))

Or, chaque dépôt adipeux a un profil endocrinien bien distinct (Fried et al., 1998; Pezeshkian et al., 2009; Samaras et al., 2010). Par exemple, contrairement au TA viscéral, le TA sous-cutané n'est pas lié aux comorbidités associées à l'obésité et pourrait même avoir un effet protecteur (Porter et al., 2009). Il a aussi été montré que le TA épicardique est métaboliquement très actif et pourrait affecter la fonction cardiaque (Mazurek et al., 2003).

Le TA est composé principalement de cellules « grasses », appelées adipocytes, qui constituent la majeure partie des réserves énergétiques corporelles. Pour cela, ils stockent les lipides sous forme de triglycérides (TG) dans une grosse et unique vacuole appelée goutte lipidique, ils sont dits uniloculaires. Leur cytoplasme est entièrement occupé par cette goutte lipidique et leur noyau est rejeté en périphérie contre la membrane plasmatique. On dénombre entre 20 et 30 milliards d'adipocytes chez un individu mince, avec un diamètre cellulaire généralement compris entre 50 et 150  $\mu\text{m}$ .

Dans le TA, les adipocytes sont séparés par des fibres de réticuline et de très nombreux capillaires sanguins ainsi que par des fibres nerveuses amyéliniques. Ils sont groupés en petits lobules séparés par

de fines cloisons conjonctives contenant de nombreux autres types cellulaires. En effet, bien que les adipocytes représentent la grande majorité des cellules du TA, 50 à 80 % de la fraction cellulaire, le TA contient également d'autres cellules jouant un rôle essentiel dans son maintien, dans le renouvellement adipocytaire ainsi que dans l'homéostasie tissulaire. Cet ensemble de cellules est appelé la fraction stroma-vasculaire (FSV). Etudions plus spécifiquement les fonctions de chacune de ces cellules et leurs altérations au cours de l'obésité.

## **II.B. Les adipocytes**

Les principales fonctions physiologiques des adipocytes sont d'une part ses propriétés anaboliques caractérisées par sa capacité à synthétiser et à stocker des (TG) et d'autre part ses propriétés cataboliques caractérisées par la voie lipolytique, c'est-à-dire l'hydrolyse des TG et la libération des acides gras non estérifiés (AGNE). Par ailleurs, l'adipocyte est capable de produire et de sécréter de nombreux facteurs exerçant des fonctions endocrines, autocrines et paracrines.

### **II.B.1. Fonctions métaboliques**

#### *II.B.1.a. La lipogenèse et la synthèse des triglycérides*

Le stockage des lipides dans les adipocytes se fait sous forme de TG. La synthèse des TG s'effectue à partir de deux principaux substrats, les AGNE et le glucose, préalablement activés en acyl-CoA et en glycérol-3-phosphate (G3P) respectivement. La principale source de lipides des adipocytes provient des lipides plasmatiques circulants. Ces lipides circulants sont soit des AGNE liés à l'albumine soit des TG incorporés dans des lipoprotéines provenant de l'alimentation ou de la lipogenèse *de novo* hépatique (Brahm and Hegele, 2015), principalement des lipoprotéines de très basse densité (VLDL) en état postabsorptif et des chylomicrons en état post-prandial. Les TG contenus dans les VLDL et les chylomicrons sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL), une enzyme sécrétée par les adipocytes et ancrée sur les cellules endothéliales des capillaires sanguins (Frayn, 2002; Preiss-Landl et al., 2002; Wang and Eckel, 2009). Les AGNE peuvent ensuite être captés par les adipocytes grâce à des protéines de transport (FATP) et à la protéine CD36 (Cluster of Differentiation 36, homologue du transporteur murin Fatty Acid Transporter (FAT)) qui semble être responsable de la majorité de la captation des lipides par les adipocytes (Ibrahimi and Abumrad, 2002). Puis, les AGNE, qui ne sont pas solubles dans le cytosol et peuvent avoir des effets toxiques sur les membranes, sont liés aux protéines de transport appelées FABP, notamment la protéine adipocyte 2 (aP2) qui est le produit du gène FABP4 (Furuhashi and Hotamisligil, 2008; Hajri and Abumrad, 2002). Pour finir, les AGNE sont activés en acyl-CoA par l'acyl-CoA synthase et peuvent être ré-estérifiés en TG en présence de G3P et ainsi stockés dans la gouttelette lipidique. En effet, la synthèse de TG nécessite du G3P pour l'étape initiale de l'estérification des AGNE. Pour cela, le glucose pénètre dans les adipocytes par un mécanisme de diffusion qui est facilité grâce à une protéine transmembranaire, la protéine GLUT4 (Glucose transporter type 4). Après son entrée dans les adipocytes, le glucose est phosphorylé en

glucose-6-phosphate par une hexokinase et entre dans la voie glycolytique pour fournir du G3P. La glycolyse produit également du pyruvate qui est transformé en acétyl-CoA (complexe pyruvate déshydrogénase) lui-même transformé en malonyl-CoA (acétyl-CoA carboxylase (ACC)) qui sera polymérisé en acide gras à longue chaîne saturé (complexe synthase des acides gras (FAS)). Plusieurs enzymes désaturases permettront la synthèse d'acides gras plus ou moins saturés. Les acides gras néosynthétisés par la voie lipogénique pourront être estérifiés en présence de G3P afin d'assurer le stockage des lipides sous formes de TG. Cette étape de lipogenèse *de novo* à partir du glucose reste un sujet très controversé dans l'accumulation des TG dans les adipocytes chez l'humain, bien qu'ils en possèdent toutes les enzymes nécessaires. D'anciennes études montraient qu'elle était quasiment absente dans le TA humain tandis qu'une étude plus récente a montré son existence, bien que beaucoup plus faible que la lipogenèse *de novo* hépatocytaire et que la synthèse de TG à partir des lipides alimentaires (Diraison et al., 2003). Finalement, en plus d'être soumise à un contrôle nutritionnel, par le glucose et les AGNE, la régulation du stockage des TG est également sensible à différentes hormones telles que l'insuline, les catécholamines et les stéroïdes. Par exemple, afin de faciliter l'entrée de glucose dans les adipocytes en situation post-prandiale, l'insuline stimule la translocation des vésicules intracytoplasmiques contenant la protéine GLUT4 vers la membrane plasmique où il y a fusion des membranes (Kersten, 2001). De plus, l'insuline active la LPL et favorise l'entrée des AGNE en stimulant l'expression de différents transporteurs FAT ainsi que leurs acheminements vers la membrane plasmique (Czech, 2002). Par contre, les catécholamines, comme l'adrénaline, inhibent le complexe multienzymatique triglycéride synthétase et par conséquent la synthèse de TG.

Chez l'humain, il a été montré que l'expression du gène FAS diminue dans le TA sous-cutané obèse (Diraison et al., 2002) et est moins stimulée après une « suralimentation » en glucides comparée à celle d'individus minces (Minehira et al., 2004). De plus, il a été observé que plus un adipocyte est petit plus il exprime les enzymes lipogéniques (Roberts et al., 2009).

Chez la souris, l'inhibition de la FAS au niveau systémique ou cérébral par des agents pharmacologiques induit une diminution de la prise alimentaire et du poids corporel (Loftus et al., 2000). De plus, la délétion du gène FAS spécifiquement dans le TA induit une augmentation des dépenses énergétiques ainsi qu'une résistance à l'obésité induite par un régime gras.

L'ensemble de ces résultats suggère que la lipogenèse *de novo* n'a probablement pas un rôle important dans l'accumulation des TG dans le TA au cours de l'obésité.

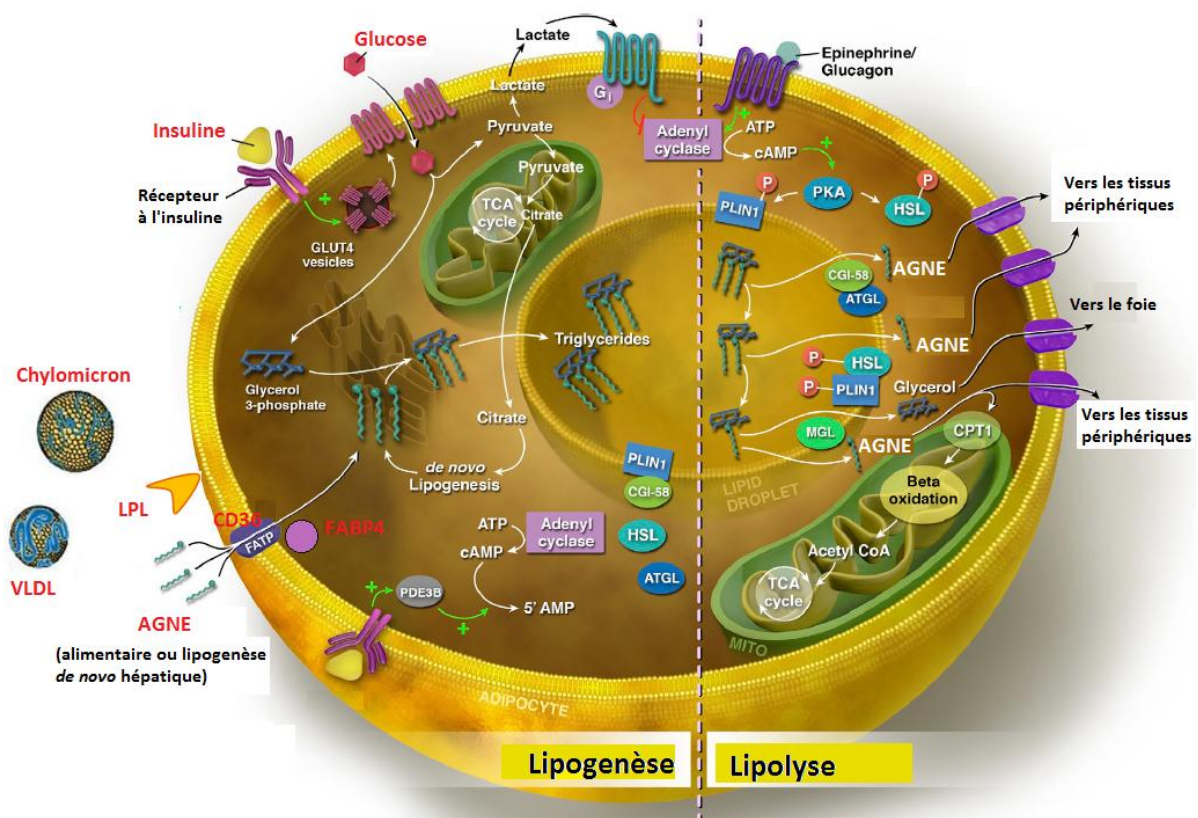
#### *II.B.1.b. La lipolyse*

La libération des AGNE se fait par l'hydrolyse des TG de la gouttelette lipidique. Ce processus est nommé lipolyse (Duncan et al., 2007; Nielsen et al., 2014). La lipolyse est principalement due à l'action de deux lipases présentes dans le cytoplasme des adipocytes, la lipase hormonosensible (HSL) et la triglycéride lipase (ATGL). Les AGNE libérés par ce processus vont dans le sang et sont

utilisables par les autres cellules de l'organisme à des fins énergétiques. La lipolyse est également soumise à un contrôle nutritionnel et plurihormonal. En effet, après une prise alimentaire, le pancréas sécrète de l'insuline afin de réduire la glycémie mais également afin d'induire un stockage des AGNE dans les adipocytes. Inversement, une insuliniémie faible induit une lipolyse accrue. La lipolyse est également stimulée par les catécholamines, comme l'adrénaline et la noradrénaline. En outre, la lipolyse est activée par les récepteurs adrénergiques  $\beta 1$  et  $\beta 3$ , et inhibée par le récepteur adrénergique  $\alpha 2$  (Louis et al., 2000; Wright and Simpson, 1981).

Chez les individus obèses, l'augmentation de la lipolyse basale conduit à l'augmentation des acides gras extracellulaires (Arner and Langin, 2014; Lafontan and Langin, 2009). Ainsi, les individus obèses ont des taux plasmatiques d'acides gras plus élevés (Horowitz and Klein, 2000). Récemment, une étude a montré que l'inhibition partielle de la lipolyse adipocytaire induit une amélioration de la sensibilité à l'insuline et de la tolérance au glucose (Girousse et al., 2013).

Il y a donc un flux constant d'AGNE entrant et sortant du TA qui est principalement régulé par l'état métabolique, nutritionnel et hormonal, qui peut être dérégulé au cours de l'obésité (**Figure 8**).



**Figure 8 : Mécanismes et régulation de la lipogenèse et de la lipolyse adipocytaire**

(D'après (Rutkowski et al., 2015))

## **II.B.2. Fonctions sécrétrice et endocrinienne**

Les adipocytes sont également de véritables cellules sécrétrices endocrines, autocrines et paracrines. En effet, les adipocytes, longtemps considérés comme de simples cellules du stockage des lipides, ont acquis le statut de cellules sécrétrices endocrines après la découverte de l'adipsine (Cook et al., 1987), dont le rôle est encore mal défini. Ensuite, il y a eu les découvertes du facteur de nécrose tumorale (TNF)- $\alpha$ , une cytokine pro-inflammatoire, puis de la leptine, une adipokine capable de communiquer avec le système nerveux central, et de l'adiponectine qui joue un rôle dans la sensibilité à l'insuline. Finalement, bien que l'ensemble des adipokines humaines ne soit toujours pas entièrement caractérisé, il a été montré que le TA peut potentiellement sécréter plus de 600 molécules (Lehr et al., 2012).

### *II.B.2.a. La leptine*

La leptine a été découverte chez la souris possédant une mutation sur le gène « ob », présent dans les adipocytes, et qui à l'état homozygote est responsable d'une obésité génétique. Chez l'humain, le gène homologue du gène « ob » a été identifié (Friedman et al., 1991), cloné (Zhang et al., 1994), et la molécule synthétisée (Pelleymounter et al., 1995). La leptine se comporte comme une hormone de la satiété, agissant par rétrocontrôle au niveau de l'hypothalamus afin de réguler l'appétit en fonction de la masse de TA créant ainsi une boucle régulatrice de la prise alimentaire. La leptine active la voie anorexigène qui coupe la faim et inhibe la voie orexigène qui stimule l'appétit (Friedman and Halaas, 1998; Morton et al., 2006; Schwartz et al., 2000). Cependant, les taux de leptine circulante (Considine et al., 1996) et l'expression de l'ARNm dans le TA (Ranganathan et al., 1998) sont augmentés chez les individus obèses, probablement en raison de l'existence d'une résistance à la leptine (Friedman and Halaas, 1998). La leptine joue également un rôle important dans la régulation de l'homéostasie du glucose, indépendamment des actions sur la consommation alimentaire, la dépense énergétique ou le poids corporel, car elle altère la signalisation de l'insuline dans les adipocytes murins (Müller et al., 1997; Pérez et al., 2004). Ainsi, il a été montré que la leptine peut induire la lipolyse (Wang et al., 1999; Zeng et al., 2015). Par ailleurs, la leptine est impliquée dans la régulation des réponses immunitaires (La Cava and Matarese, 2004). En effet, la leptine favorise la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL (interleukine)-2 et l'IFN (interféron)- $\gamma$ , mais elle inhibe également la production de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-4 (Lord et al., 1998). De façon concomitante, les taux de leptine circulante et son expression dans le TA sont augmentés en réponse à des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ , et au LPS (lipopolysaccharide) (Grunfeld et al., 1996). En conséquence, les interactions entre la leptine et l'inflammation sont bidirectionnelles, les cytokines pro-inflammatoires augmentent sa synthèse et sa libération qui à son tour contribue à maintenir un état inflammatoire chronique au cours de l'obésité.

### *II.B.2.b. L'adiponectine*

L'adiponectine a été découverte dans les années 1990 par quatre groupes indépendants. Elle est principalement produite et sécrétée par les adipocytes (Scherer et al., 1995), mais il a été récemment

montré qu'elle pouvait également être sécrétée par les cardiomyocytes et les muscles squelettiques (Brochu-Gaudreau et al., 2010). L'adiponectine est retrouvée dans des concentrations élevées au niveau systémique chez les adultes sains, environ mille fois supérieures à celles de la leptine (Whitehead et al., 2006). Deux récepteurs « fonctionnels » de l'adiponectine ont été identifiés, AdipoR1 et AdipoR2. En effet, un troisième récepteur a été décrit, la T-cadhérine (Hug et al., 2004), qui est fortement exprimé dans les régions d'athérosclérose et ayant pour rôle de protéger les cellules endothéliales de l'apoptose induite par le stress oxydatif (Joshi et al., 2005; Takeuchi et al., 2007). Cependant, la T-cadhérine est uniquement exprimée sur les cellules endothéliales et les muscles lisses, mais ni dans les hépatocytes ni dans le foie qui est l'organe cible de l'adiponectine (Combs et al., 2001; Kubota et al., 2006; Nawrocki et al., 2006). En outre, le récepteur T-cadhérine n'a aucun effet sur la signalisation ou la fonction cellulaire de l'adiponectine, puisque qu'il n'a pas de domaine intracellulaire (Kadowaki et al., 2006). AdipoR1 est ubiquitaire, mais est très exprimé dans le muscle squelettique et lié à l'activation de la voie de la kinase AMPK. AdipoR2 est principalement exprimé dans le foie et associé à l'activation de la voie du récepteur  $\alpha$  activé par les proliférateurs de peroxyssomes (PPAR- $\alpha$ ) (Yamauchi et al., 2003, 2007). L'activation des récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 a de nombreux effets bénéfiques. En effet, cela induit l'augmentation de l'oxydation des acides gras au niveau du foie et des muscles squelettiques, l'augmentation du captage glucidique cellulaire, la diminution de la néoglucogenèse hépatique, et l'inhibition de l'inflammation ainsi que du stress oxydatif (Yamauchi et al., 2002; Yoon et al., 2006). Finalement bien que le rôle physiologique de l'adiponectine ne soit pas parfaitement clair et ne semble pas être essentiel à la survie (Ziemke and Mantzoros, 2010), elle joue un rôle essentiel dans la sensibilisation à l'insuline, la protection vasculaire et est également anti-inflammatoire (Hu et al., 1996; Maeda et al., 2002; Maury and Brichard, 2010; Robinson et al., 2011). Or, chez les individus obèses l'expression de l'adiponectine dans le TA est plus faible que chez les individus minces. De plus, les taux d'adiponectine corréleront négativement avec l'IMC et l'expression de TNF- $\alpha$  dans le TA, et au contraire corréleront positivement avec la sensibilité à l'insuline (Kern et al., 2003). Finalement, il a également été montré que les deux récepteurs de l'adiponectine, AdipoR1 et AdipoR2, sont significativement diminués dans le muscle et le TA des souris insulino-résistantes (ob/ob), probablement en partie à cause de l'hyperinsulinémie liée à l'obésité (Tsuchida et al., 2004). Ainsi, l'obésité diminue non seulement les taux plasmatiques de l'adiponectine, mais aussi l'expression de ses récepteurs, réduisant la sensibilité à l'adiponectine et conduisant ainsi à une résistance à l'insuline, qui à son tour aggrave l'hyperinsulinémie, créant ainsi un cercle vicieux.

#### *II.B.2.c. Les autres adipokines*

Les adipocytes sécrètent également une multitude d'autres molécules, comme l'adipsine, l'apeline, des œstrogènes, des facteurs angiogéniques, des prostaglandines, des chimiokines, des protéines du complément, etc. Cependant, les adipokines proviennent également des autres types cellulaires

composant le TA et sont régulées de façon spécifique au cours de l'obésité (**Tableau 3**).

En effet, l'origine cellulaire précise des différents facteurs inflammatoires du TA fait débat. L'isolement et l'analyse des différentes fractions cellulaires indiquent que les adipocytes expriment et sécrètent *in vitro* des cytokines comme le TNF- $\alpha$  (Hotamisligil et al., 1993) et l'IL-6 (Fried et al., 1998). Cependant l'importance de la FSV dans la production de facteurs inflammatoires par le TA est importante (Bouloumié et al., 2005; Fain et al., 2004; Wellen and Hotamisligil, 2003).

<b>Adipokines</b>	<b>Fonctions</b>	<b>Sécrétées par les</b>	<b>Obésité</b>
Acides gras libres	Métabolisme lipidique	Adipocytes	Augmente
Adiponectine	Anti-inflammatoire ; sensibilité à l'insuline	Adipocytes	Diminue
Adipsine (facteur D du complément)	Réponse immunitaire ; anti-lipolytique ; améliore la fonction des cellules $\beta$	Adipocytes et macrophages	Augmente
Angiotensinogène	Homéostasie vasculaire	Adipocytes et FSV	Augmente
Apeline	Sensibilité à l'insuline	Adipocytes, FSV et macrophages	Augmente
CCL2 (MCP-1)	Inflammation ; résistance à l'insuline ; athérosclérose	Adipocytes et FSV	Augmente
CRP	Inflammation	FSV	Augmente
FABP4	Métabolisme lipidique	Adipocytes et macrophages	Augmente
Hormones stéroïdiennes	Métabolisme lipidique ; résistance à l'insuline	Adipocytes et pré-adipocytes	Augmente
IL-10	Anti-inflammatoire ; sensibilité à l'insuline	Macrophages	Augmente
IL-18	Inflammation ; résistance à l'insuline ; diminue la prise alimentaire	FSV	Augmente
IL-1 $\beta$	Inflammation ; résistance à l'insuline ; athérosclérose	Adipocytes et macrophages	Augmente
IL-6	Inflammation ; résistance à l'insuline ; athérosclérose	Adipocytes et FSV	Augmente
IL-8	Inflammation ; athérosclérose	Adipocytes et FSV	Augmente
Leptine	Régulation de la prise alimentaire, l'angiogenèse et le système immunitaire	Adipocytes	Augmente
LPL	Métabolisme lipidique	Adipocytes	Augmente
Omentine	Résistance à l'insuline	FSV et macrophages	Diminue
PAI-1	Inflammation ; homéostasie vasculaire	Adipocytes et FSV	Augmente
Prostaglandines	Régule le flux sanguin, la lipolyse et la différenciation cellulaire	Adipocytes et FSV	Augmente
RBP4	Résistance à l'insuline	Adipocytes et macrophages	Augmente
Résistine	Inflammation ; résistance à l'insuline	Adipocytes et macrophages	Variable
TGF- $\beta$	Adhérence, migration, croissance, différenciation cellulaire et fibrose	Adipocytes et FSV	Augmente
Thrombospondine	Angiogenèse	Adipocytes	Augmente
TNF- $\alpha$	Inflammation ; résistance à l'insuline ; athérosclérose	Adipocytes et FSV	Augmente
Visfatine (Namt)	Inflammation ; augmente la sécrétion d'insuline	Adipocytes et FSV	Augmente

**Tableau 3 : Fonctions, origines cellulaires et régulation au cours de l'obésité des principales adipokines**

(D'après (Badimon et al., 2015))

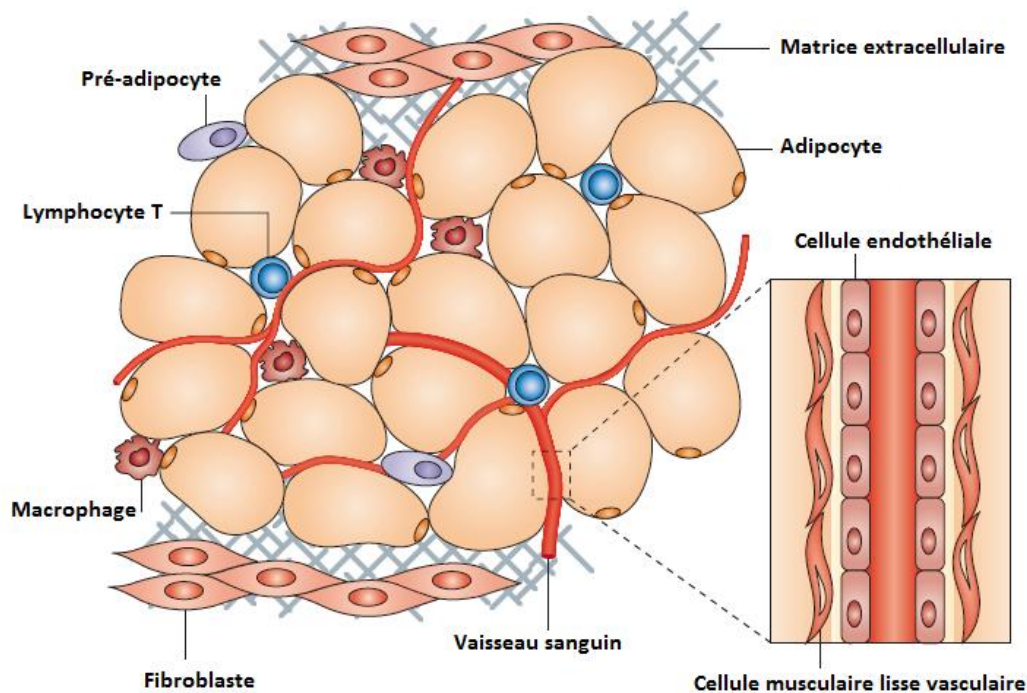


## II.C. La fraction stroma-vasculaire

Bien que les adipocytes soient le composant cellulaire majeur du TA de par leur nombre, 50 à 80 % de la fraction cellulaire, leur régulation du stockage énergétique et leur fonction endocrinienne, le TA est également composé d'un mélange hétérogène de cellules qui jouent un rôle dans le maintien et l'homéostasie tissulaire, participent grandement à la sécrétion d'adipokines et régule la plasticité et l'expansion du tissu. Cet ensemble de cellules constitue la FSV du TA (**Figure 9**) et est composée de :

- Cellules souches mésenchymateuses et pré-adipocytes qui formeront des adipocytes matures en fonction de la balance énergétique, des conditions hormonales et de nutrition.
- Fibroblastes qui assurent le renouvellement de la matrice extracellulaire grâce à la sécrétion et à la destruction des fibres et des collagènes *via* les métalloprotéinases matricielles (MMPs).
- Cellules endothéliales et péricytes qui ont un rôle essentiel dans la vascularisation et l'angiogenèse tissulaire.
- Cellules immunitaires qui maintiennent l'homéostasie du tissu.

Les cellules immunitaires de la FSV ayant fait l'objet de mes travaux de thèse, un chapitre spécifique leur est dédié (**III**).



**Figure 9 : Représentation approximative de la composition du tissu adipeux**

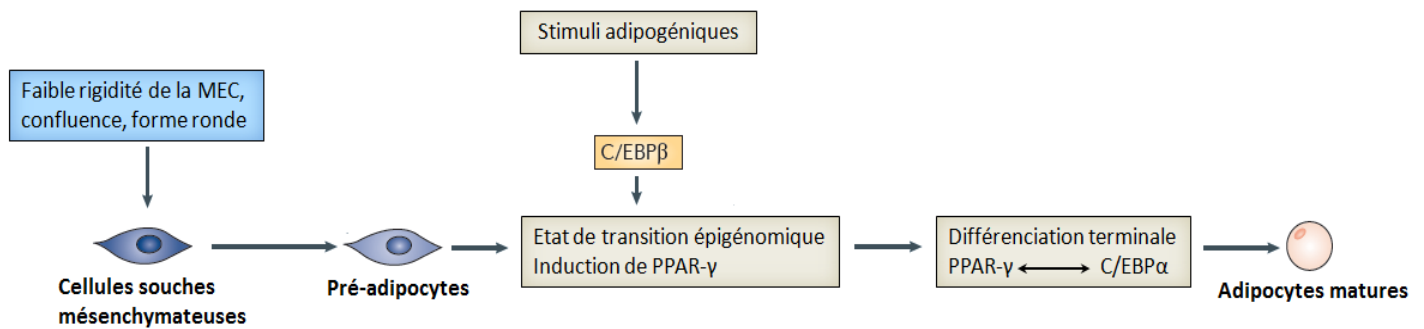
(D'après (Ouchi et al., 2011))



### II.C.1. Les pré-adipocytes et l'adipogenèse

De nombreux travaux suggèrent l'existence de cellules souches mésenchymateuses (CSMs) au sein du TA (Björntorp et al., 1978; Rodriguez et al., 2005). Les cellules de la FSV humaine peuvent acquérir *in vitro* des marqueurs biochimiques caractéristiques de lignages cellulaires variés, y compris myogénique (Rodriguez et al., 2005), chondrogénique (Erickson et al., 2002), ostéogénique (Halvorsen et al., 2001), et même exprimer des marqueurs spécifiques des cellules endothéliales en fonction des conditions de culture (Miranville et al., 2004). En outre, la FSV contient des pré-adipocytes qui en condition adipogénique peuvent acquérir les fonctions métaboliques et sécrétoires des adipocytes matures (Sengenès et al., 2005).

En effet, les adipocytes sont des cellules matures et ne peuvent pas se diviser. Ainsi, pour augmenter le nombre d'adipocytes en fonction de la balance énergétique, des conditions hormonales et de nutrition, il y a une différenciation cellulaire à partir de CSMs puis de pré-adipocytes, nommée adipogenèse (Lowe et al., 2011; Tang and Lane, 2012). Elle est très étudiée depuis le développement de la lignée cellulaire murine 3T3 (Green and Kehinde, 1975). Ainsi malgré les avancées dans l'analyse de la différenciation adipocytaire *in vivo* (Wang et al., 2013b), la majeure partie des études se font *in vitro*, principalement sur la lignée murine 3T3-L1. Cette différenciation adipocytaire se divise en deux étapes majeures, tout d'abord l'étape de détermination des CSMs vers la lignée adipocytaire des adipoblastes, puis l'étape de différenciation adipocytaire proprement dite des pré-adipocytes en adipocytes matures. L'acteur central de cette différenciation adipocytaire est le récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR)- $\gamma$  (Rosen et al., 1999, 2002; Tontonoz et al., 1994). Quand ce récepteur est activé par un ligand agoniste dans un pré-adipocyte, un programme de différenciation complet et complexe est stimulé, incluant des modifications morphologiques, une accumulation lipidique et l'expression d'un large panel de gènes spécifiques des adipocytes matures. Les facteurs de transcription de la famille des C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) jouent aussi un rôle important dans l'adipogenèse. En effet, le C/EBP $\beta$  et le C/EBP $\delta$  induisent l'expression de PPAR- $\gamma$  au début de la différenciation et le C/EBP $\alpha$  la maintient dans les phases tardives (Farmer, 2006). De plus, le PPAR- $\gamma$  et le C/EBP $\alpha$  s'auto-régulent grâce à un rétro-contrôle positif qui joue un rôle central dans la différenciation (Wu et al., 1999). Ainsi, les C/EBPs et le PPAR- $\gamma$  activent directement de nombreux gènes impliqués dans la phase finale de la différenciation (**Figure 10**). Des études sur le génome entier des adipocytes matures ont montré que le PPAR- $\gamma$  et les C/EBPs induisent environ 60 % des gènes adipocytaires durant la phase terminale de différenciation et sont nécessaires à leur maintien (Lefterova et al., 2008).



**Figure 10 : Principaux régulateurs de l'adipogenèse**

(D'après : (Cristancho and Lazar, 2011))

(La différenciation des CSMs multipotentes en adipocytes matures implique une intégration complexe de modifications cyto-architecturales, de voies de signalisation et de facteurs transcriptionnels. La première étape de l'adipogenèse est la transition des cellules souches embryonnaires en CSMs (non représentée ici). Puis, les CSMs se transforment en pré-adipocytes en fonctions de différents facteurs tels que la rigidité de la matrice extracellulaire (MEC), la confluence ou la forme des cellules. Finalement, les pré-adipocytes peuvent se différencier en adipocytes matures en fonction des stimuli adipogéniques tels que les glucocorticoïdes, l'insuline et l'adénosine monophosphate cyclique).

Malgré la connaissance de l'adipogenèse, en tout cas *in vitro* (Gregoire et al., 1998), les pré-adipocytes sont un type cellulaire peu caractérisé phénotypiquement. Actuellement, il n'existe pas un marqueur antigénique spécifique de ce type cellulaire, il faut une combinaison de marqueurs (Estève et al., 2015). De plus, chez l'humain, le renouvellement des adipocytes matures et l'induction de l'adipogenèse sont relativement faibles (Spalding et al., 2008).

Au cours de l'obésité, les cytokines pro-inflammatoires peuvent inhiber l'adipogenèse en diminuant l'activité de PPAR-γ (Guilherme et al., 2008). Il a également été montré chez l'humain que du milieu conditionné de macrophages de TA obèse pouvait inhiber l'adipogenèse des pré-adipocytes (Keophiphath et al., 2009; Lacasa et al., 2007).

## **II.C.2. Les cellules endothéliales et l'angiogenèse**

Différentes études basées sur des méthodes immunohistochimiques quantitatives ont permis d'identifier un important réseau vasculaire dans le TA, dénombrant environ un capillaire par adipocyte (Ledoux et al., 2008; Xue et al., 2010). Cette vascularisation régule rigoureusement le développement du TA. Il est possible de distinguer la vasculogenèse, c'est-à-dire la différenciation des cellules endothéliales à partir de cellules souches embryonnaires, de l'angiogenèse (ou néovascularisation) correspondant au développement de l'arbre vasculaire à partir de vaisseaux préexistants principalement constitués de cellules musculaires lisses, de péricytes et de cellules endothéliales. Les cellules endothéliales sont les principales cellules constituant les vaisseaux sanguins. Elles régulent les

échanges des métabolites et des cellules entre le TA et le sang. Elles sont en contact étroit avec les péricytes, régulateurs importants des fonctions vasculaires et de la stabilisation des néovaisseaux (Imhof and Aurrand-Lions, 2006). Or, l'angiogenèse résulte d'un ensemble de signaux ciblant en particulier ces deux types cellulaires (Christiaens and Lijnen, 2010) (**Figure 11**).

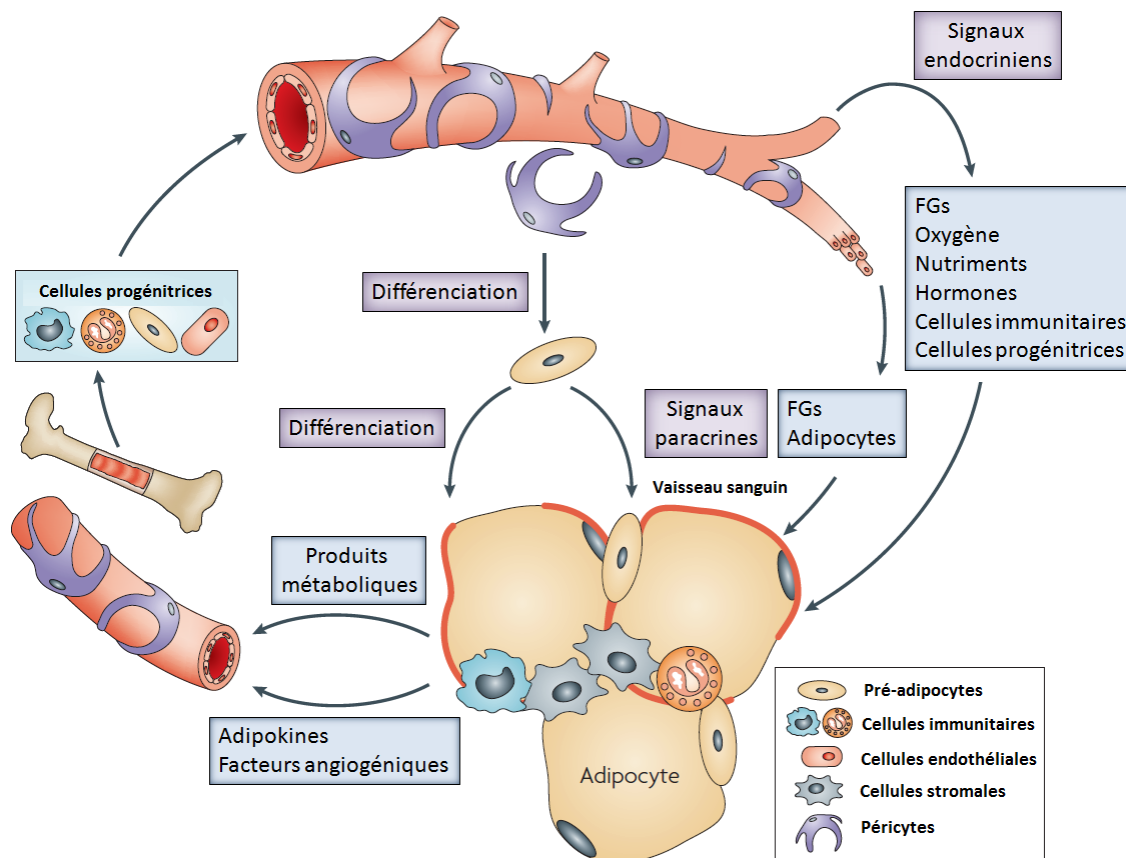
Si les vaisseaux sont généralement quiescents à l'âge adulte (Wong et al., 1997), l'angiogenèse peut intervenir en conditions pathologiques, notamment dans la croissance tumorale (Welter et al., 2013) et dans des maladies inflammatoires chroniques (Costa et al., 2007). Par contre, en condition physiologique, le TA est un des tissus les plus angiogéniques du fait de sa grande plasticité de stockage (Wong et al., 1997). En effet, l'activité angiogénique du TA a été démontrée dans de nombreuses études et est même utilisée cliniquement afin de favoriser la réparation tissulaire (Silverman et al., 1988). Il a été montré que l'angiogenèse est cruciale pour, le développement du TA, l'adipogenèse et l'expansion du TA (Hahn and Novak, 1975; Lijnen, 2008). Pour cela, le réseau vasculaire fournit de manière adéquate de l'oxygène, des composants nutritifs, des facteurs de croissance (FGs), des hormones, des cellules immunitaires et des cellules souches dérivées de la moelle osseuse afin de maintenir l'homéostasie du TA et permettre son expansion (Cao, 2010; Rupnick et al., 2002).

Cependant l'obésité peut induire une rarification des capillaires sanguins dans le TA résultant à une hypoxie tissulaire (Pasarica et al., 2009; Ye et al., 2007). La réduction du flux sanguin dans le TA obèse peut contribuer à la nécrose des adipocytes par ischémie induisant ainsi un recrutement et une prolifération des macrophages entraînant une inflammation tissulaire. Or les facteurs pro-inflammatoires activent les cellules endothéliales et induisent un phénotype dysfonctionnel (Takaoka et al., 2009). Ainsi, l'endothélium activé exprime des molécules d'adhésions et des chimiokines qui accélèrent et localisent l'inflammation du TA. En outre, il a également été récemment montré que les cellules endothéliales du TA obèse sont plus inflammatoires que celles du TA mince. De plus, en présence d'adipocytes matures elles peuvent induire une diminution de la lipolyse, de la sécrétion de l'adiponectine et de la leptine, et de la sensibilité à l'insuline, ainsi qu'une augmentation de la sécrétion de molécules inflammatoires par les adipocytes (Pellegrinelli et al., 2014a). Donc, le statut fonctionnel des cellules endothéliales peut avoir un rôle central en médiant les effets des maladies métaboliques sur le système cardiovasculaire et en contrôlant le statut métabolique de l'organisme, de manière positive ou négative, en régulant le microenvironnement du TA. De plus, la densité des capillaires est plus faible dans le TA obèse et la largeur des vaisseaux plus importante suggérant une vascularisation moins efficace. En accord avec cette hypothèse, il a été montré que les cellules endothéliales du TA viscéral d'individus obèses sont dans un état de sénescence qui est associé à une augmentation de leur statut pro-inflammatoire (Villaret et al., 2010).

L'angiogenèse est induite par différentes hormones et FGs connus pour être augmentés dans l'obésité tels que la leptine, le bFGF (facteur de croissance des fibroblastes) et le HGF (facteur de croissance des hépatocytes) (Bell et al., 2006; Rehman et al., 2004; Salcedo et al., 1999; Vona-Davis and Rose, 2009), ainsi que par de nombreux médiateurs de l'inflammation tels que des facteurs hématopoïétiques, des cytokines, et certaines chimiokines (Costa et al., 2007; Rose et al., 2004). Ainsi, les vaisseaux néoformés participent alors à l'acheminement des cellules immunitaires au site de l'inflammation. Cependant, le seul véritable FG des cellules endothéliales est le VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire), notamment le VEGF-A qui est essentiel dans l'initiation du programme angiogénique (Ferrara et al., 2003; Olsson et al., 2006; Roy et al., 2006). Il exerce naturellement son activité pro-angiogénique dans le TA (Zhang et al., 1997). La sécrétion de VEGF-A est régulée par l'hypoxie, l'insuline, des FGs et certaines cytokines (Liekens et al., 2001; Rocha, 2007), et augmente au cours de l'adipogenèse (Claffey et al., 1992; Rehman et al., 2004). Le VEGF-A possède deux récepteurs VEGF-R1 et VEGF-R2, exprimés par les cellules endothéliales, mais il semble que le VEGF-R2 joue un rôle primordial dans l'expansion du TA (Tam et al., 2009), en induisant l'adipogenèse (Fukumura et al., 2003). Il a été montré que l'inhibition de l'angiogenèse dans des souris obèses induit une diminution du poids corporel et de la masse adipeuse ainsi qu'une amélioration du statut métabolique (Bråkenhielm et al., 2004; Kolonin et al., 2004; Rupnick et al., 2002). Or, il a également été démontré que l'inhibition de la signalisation du VEGF-A conduit à une diminution de l'adipogenèse et à une réduction de la masse du TA, ce qui conduit à l'hypothèse que l'adipogenèse et l'angiogenèse sont mutuellement régulées (Fukumura et al., 2003; Nishimura et al., 2007). De plus, l'obésité diminue des facteurs anti-inflammatoires tels que l'adiponectine qui joue un rôle important dans l'homéostasie vasculaire et l'angiogenèse (Ouchi et al., 2011). L'ensemble de ces résultats incite à réaliser de nouvelles études sur le rôle des adipokines dans le contrôle de la croissance vasculaire et des fonctions métaboliques au cours de l'obésité.

La surexpression du VEGF-A dans le TA de souris sous régime gras (HFD) les protège contre l'obésité et la résistance à l'insuline (Elias et al., 2012; Sun et al., 2012). Cette protection passe peut-être par le recrutement accru de macrophages anti-inflammatoires (Elias et al., 2012). Bien que le VEGF-A ait été largement étudié chez les individus obèses et dans des modèles animaux, les résultats ne sont pas clairs. En effet, il y a des résultats contradictoires concernant la régulation du niveau systémique et local au sein du TA du VEGF-A. Plusieurs études montrent que les taux systémiques du VEGF-A corrélaient avec l'IMC (Loebig et al., 2010; Silha et al., 2005). Cependant, une étude n'a pas reproduit ces résultats (Rehman et al., 2003), et deux autres montrent même une diminution de l'expression du VEGF-A dans le TA de souris obèses (Halberg et al., 2009) et d'individus obèses (Pasarica et al., 2009). Il a également été montré que l'expression du VEGF-A augmente dans le TA obèse comparé au TA mince mais diminue dans le TA obèse insulino-résistant (Tinahones et al., 2012). En outre, le VEGF-A est trouvé diminué dans d'autres tissus chez des individus diabétiques et ne

répondant pas correctement à une hypoxie. Ainsi, le DT2 est associé à une mauvaise réponse, à la suite d'événements vasculaires occlusifs aigus, par une diminution de la capacité à former de nouvelles microvascularisations compensatoires adéquates en réponse à une ischémie (Chou et al., 2002; Thangarajah et al., 2009). Cela indique clairement un rôle protecteur du VEGF-A contre la résistance à l'insuline induite par l'obésité. L'élucidation des mécanismes précis par lesquels le VEGF-A exerce ces actions sur le TA nécessite d'autres études, et une meilleure compréhension des actions du VEGF-A sur le métabolisme serait d'une importance cruciale pour le développement de traitements contre l'obésité et les comorbidités associées.



**Figure 11 : Mécanismes de l'angiogenèse du tissu adipeux**

Note : tous ces mécanismes peuvent être altérés au cours de l'obésité

(D'après : (Cao, 2010))

(Le développement des vaisseaux sanguins dans le TA fournit des FGs, de l'oxygène, des nutriments, des hormones, des cellules immunitaires et des CSMs de la moelle osseuse afin de maintenir les fonctions homéostatiques des adipocytes et l'expansion du TA. De plus, les cellules périvasculaires telles que les péricytes peuvent se différencier en pré-adipocytes. Les adipocytes produisent également des facteurs angiogéniques et des adipokines qui induisent l'angiogenèse. Pour finir, la vascularisation du TA peut éliminer les produits métaboliques des adipocytes. **Tous ces mécanismes peuvent être altérés au cours de l'obésité).**

## **II.D. Inflammation du tissu adipeux**

### **II.D.1. Définition de l'inflammation chronique de bas grade**

Contrairement à l'inflammation aiguë qui est une réaction immunitaire rapide avec pour symptômes la rougeur, la chaleur, le gonflement et la douleur, l'inflammation chronique de bas grade est sans signes cliniques. Elle est le reflet d'une phase anormale de l'inflammation, caractérisée par sa persistance dans le temps, d'où le terme chronique. En effet, c'est une réaction lente et sournoise qui peut durer plusieurs mois, voire plusieurs années, dont les symptômes sont multiples et variés et qui ont la particularité d'être récurrents. Ces symptômes « alarmes » nous avertissent d'une maladie en devenir, ainsi toute pathologie est le résultat d'une inflammation chronique de bas grade. Le maintien du phénomène inflammatoire sous-tend tout d'abord la persistance de la lésion tissulaire initiale, le tissu ne se régénère pas correctement. Ainsi, il existe un infiltrat inflammatoire qui persiste contenant tous les types de cellules immunitaires. Enfin, un phénomène de cicatrisation pathologique s'installe, c'est la fibrose. La fibrose est définie par un accroissement de la composante fibrillaire de la matrice extracellulaire, notamment par l'augmentation de la proportion des collagènes. C'est cette dernière caractéristique qui prédomine dans l'inflammation chronique, et qui peut être responsable de la perte ou de la diminution de la fonction de l'organe touché. Pour finir, alors que dans l'inflammation aiguë il existe une séquence stéréotypée (agression puis phase vasculaire, cellulaire et enfin cicatrisation), dans l'inflammation chronique les phénomènes d'inflammation, de destruction tissulaire (nécrose) et de réparation (fibrose) coexistent.

Or, une des anomalies majeures caractérisant le TA des individus obèses est une inflammation chronique de bas grade principalement liée à l'infiltration et à la prolifération de cellules immunitaires pro-inflammatoires au sein du TA. Le nombre des molécules contribuant à caractériser l'inflammation chez les individus obèses ne cesse d'augmenter ces dernières années, ainsi on peut véritablement parler de « cocktail » inflammatoire dont les taux s'élèvent modérément au cours de l'obésité (Bastelica et al., 2002; Trayhurn, 2005). Ce phénomène est au cœur des mécanismes par lesquels le TA entraîne les comorbidités associées à l'obésité (Hotamisligil, 2006). En effet, cet état inflammatoire du TA est associé à une production anormale d'adipokines et de molécules inflammatoires qui vont contribuer à générer des complications fonctionnelles au niveau du TA lui-même mais également au niveau systémique, ce qui va étendre les complications fonctionnelles aux autres organes. De plus, l'inflammation peut contribuer à la mise en place d'une fibrose au sein du TA, ce qui constitue un facteur supplémentaire de dysfonction cellulaire, et est impliquée dans la résistance à la perte de poids.

Finalement, suite à une perte de poids, induite par une restriction calorique ou par une chirurgie bariatrique, les taux circulants de ces marqueurs de l'inflammation diminuent (Dalmas et al., 2011a; Poitou et al., 2005). Or, la diminution de ces marqueurs de l'inflammation au niveau systémique est généralement associée à l'amélioration des comorbidités (Ziccardi et al., 2002).

Ainsi mieux comprendre les mécanismes qui initient cette inflammation du TA et ceux qui contribuent à la maintenir est primordial dans la prise en charge de l'obésité.

## **II.D.2. Facteurs déclencheurs de l'inflammation au cours de l'obésité**

### *II.D.2.a. Acides gras, stress du réticulum endoplasmique et stress oxydant*

Tout d'abord, l'augmentation du flux de nutriment dans les adipocytes pourrait être un des événements initiateur de l'inflammation du TA. Par exemple, il a été montré que l'administration de lipides dans des souris induit une réponse inflammatoire après seulement quelques heures de traitement (Watt et al., 2006). A l'inverse, la perte de poids suite à une restriction calorique entraîne une diminution de l'inflammation (Kurki et al., 2012; Wang et al., 2013a). Ainsi, une des théories pour expliquer l'origine de l'inflammation associée à l'obésité serait que les nutriments soient naturellement inflammatoires. Par exemple, une étude a montré qu'en condition normale d'apport de nutriments, afin d'atténuer l'inflammation physiologique induite par les nutriments, les adipocytes peuvent s'adapter au stress métabolique en augmentant l'expression de protéines anti-inflammatoires telles que STAMP2 (protéine prostatique à six domaines transmembranaires). Mais, au cours de l'obésité, l'apport excessif répété en nutriment pourrait conduire à une perte de la réponse anti-inflammatoire des adipocytes (Wellen et al., 2007). De plus, il a été montré que les acides gras saturés (AGS) peuvent induire une inflammation dans les adipocytes *via* le TLR4 (récepteur de type Toll 4) (Shi et al., 2006). En outre, certains dérivés des acides gras tels que les céramides ou même le glucose peuvent aussi induire une inflammation et une résistance à l'insuline *via* l'inflammasome NLRP3 (récepteur de type NOD) (Stienstra et al., 2011a; Vandanmagsar et al., 2011; Wen et al., 2011).

L'augmentation de l'apport en nutriments peut également perturber l'homéostasie de différentes organelles telles que le réticulum endoplasmique (RE). Or, il a été montré que dans le TA de souris obèses il y a une augmentation du stress du RE associée à l'inflammation et à la résistance à l'insuline (Hotamisligil and Erbay, 2008; Ozcan et al., 2004). Ce stress du RE peut être induit par différentes molécules telles les AGS et le glucose qui augmentent dans TA au cours de l'obésité (Gregor and Hotamisligil, 2007). Finalement, le stress du RE dans les adipocytes inhibe la signalisation de l'insuline (Gual et al., 2005), augmente la lipolyse (Bogdanovic et al., 2015; Deng et al., 2012), et induit un profil sécrétoire pro-inflammatoire (Hotamisligil and Erbay, 2008; Kawasaki et al., 2012). Chez l'humain, il a également été observé que le stress du RE est augmenté dans le TA obèse et diminué après une perte de poids induite par la chirurgie bariatrique (Gregor and Hotamisligil, 2007; Gregor et al., 2009). Le stress du RE peut également être la source d'un stress oxydatif, processus qui peut aussi déclencher une inflammation (Furukawa et al., 2004; Marseglia et al., 2015). Inversement, l'inflammation et le stress oxydant peuvent induire un stress du RE créant ainsi un cercle vicieux qui perpétuent les complications métaboliques associées à l'obésité (Malhotra and Kaufman, 2007).

Finalement, les acides gras, le stress du RE et le stress oxydant sont des mécanismes moléculaires reliant l'obésité à l'insulinorésistance et au DT2, et sont susceptibles d'intervenir dans l'initiation et le maintien de l'inflammation du TA.

#### *II.D.2.b. Hypertrophie et hypoxie adipocytaires*

Lors de l'obésité, le TA subit une expansion importante résultant principalement de l'augmentation de la taille des adipocytes, c'est l'hypertrophie adipocytaire. Bien que tous les individus obèses subissent cette expansion du TA, elle n'est pas nécessairement associée à des désordres pathologiques, en effet il y a des individus obèses « métaboliquement sains » (Carnethon et al., 2012; Ruderman et al., 1981; Wildman et al., 2008). On peut donc penser que ces personnes ont une expansion « saine » du TA, limitant la lipotoxicité des dépôts ectopiques et conservant la sensibilité à l'insuline systémique (Unger and Scherer, 2010). Cependant l'hypertrophie adipocytaire induit une augmentation de la sécrétion de diverses chimiokines et cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , la CCL2, l'IL-6 et l'IL-8 (Jernås et al., 2006; Skurk et al., 2007; Sopasakis et al., 2004).

De plus, l'hypertrophie peut rendre un adipocyte tellement large qu'il atteint la limite de diffusion de l'oxygène à travers la cellule, et ainsi créer des zones de micro-hypoxie dans le TA (Trayhurn and Wood, 2004). Or, ce phénomène d'hypoxie est très néfaste pour la biologie cellulaire et provoque un dysfonctionnement du TA (Hosogai et al., 2007; Ye et al., 2007). Un des régulateurs clés de l'hypoxie et de l'homéostasie oxygénique est le facteur HIF (facteurs induits par l'hypoxie) (Brahimi-Horn and Pouyssegur, 2007; Brahimi-Horn et al., 2007). Il existe trois isoformes du facteur HIF, mais HIF-1 est l'isoforme la plus étudiée car elle est ubiquitaire. En tant que facteur de transcription, HIF-1 fonctionne comme un hétérodimère, avec une sous-unité HIF-1 $\alpha$  sensible aux variations oxygéniques et une sous-unité HIF-1 $\beta$  constitutivement exprimée. En fait, la synthèse de HIF-1 $\alpha$  est indépendante de la concentration d'oxygène mais sa dégradation est augmentée en condition normoxique (Kaelin and Ratcliffe, 2008).

Or, HIF-1 $\alpha$  stimule une multitude d'adipokines pro-inflammatoires telles que MIF, PAI-1, CCL2 et IL-6 (Chen et al., 2006; Hosogai et al., 2007; Lee et al., 2014b; Lolmède et al., 2003; Ye et al., 2007). L'augmentation de la production des cytokines provient principalement de l'activation de voies NF- $\kappa$ B, C/EBP et MAP kinases (O'Rourke et al., 2011; Teng et al., 2002). Il a aussi été montré par immuno-marquage que les zones hypoxiques du TA sont riches en cellules immunitaires (Rausch et al., 2008) et que les marqueurs qui caractérisent les macrophages du TA sont inversement corrélés à la pression partielle en oxygène chez l'humain (Pasarica et al., 2009). Au contraire, l'hypoxie diminue l'expression de molécules anti-inflammatoires telles que l'adiponectine (Chen et al., 2006).

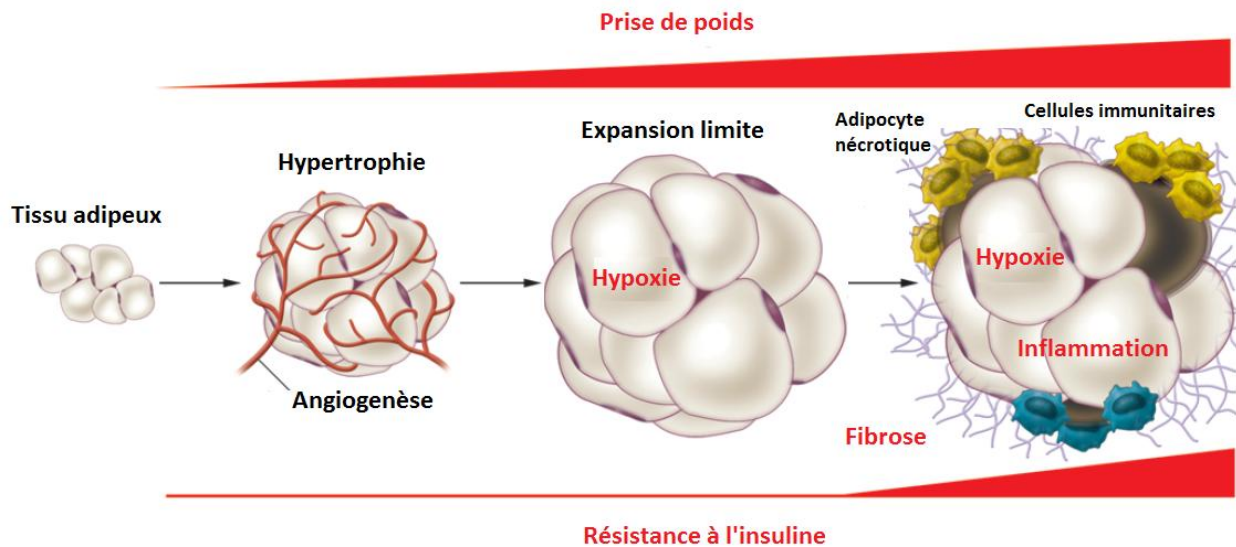
En outre, pour étudier les effets d'HIF-1 $\alpha$  dans le TA, une équipe a développé un modèle murin dans lequel HIF-1 $\alpha$  est surexprimé dans les adipocytes (Halberg et al., 2009). De façon inattendue, les



auteurs de cette étude n'ont ni observé d'augmentation des gènes classiquement régulés par HIF-1 $\alpha$ , tels que le VEGF-A, ni des gènes impliqués dans l'angiogenèse ou la glycolyse anaérobie. Finalement, la modification principale dans ce modèle était l'augmentation de la fibrose, caractérisée par une induction de la LOX (lysyl oxydase), de l'élastine, des collagènes (COL) de type I et III, de TIMP1 (inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases-1) et de CTGF (facteur de croissance de tissu conjonctif). Ainsi, on peut penser que l'hypoxie induite par l'hypertrophie adipocytaire est retransmise par l'augmentation du facteur HIF-1 $\alpha$  qui lui-même induit la production aberrante de MEC (matrice extracellulaire) et ainsi, de façon chronique, résulte à une fibrose qui est un facteur clé de la stimulation de l'inflammation au sein du TA obèse.

Chez l'humain, le sujet fait débat car si certaines études ont mis en évidence des zones hypoxiques suggérant une mauvaise oxygénation dans le TA d'individus obèses (Kabon et al., 2004; Lawler et al., 2016; Virtanen et al., 2002), plus récemment ce concept a été remis en cause (Goossens et al., 2011; Hodson, 2014; Hodson et al., 2013). De plus, bien que certains adipocytes hypertrophiques puissent atteindre un diamètre supérieur à la distance de diffusion de l'oxygène à travers une cellule, qui est en moyenne de 100 à 160  $\mu$ m (Gatenby and Gillies, 2004), il y a une faible proportion d'adipocytes > 100  $\mu$ m dans le TA mince ou obèse chez l'humain (Goossens et al., 2011; Skurk et al., 2007).

Ainsi, bien que l'hypertrophie adipocytaire peut être bénéfique pour atténuer les dépôts lipidiques ectopiques, cela peut aussi avoir des effets délétères tels que l'hypoxie tissulaire et l'altération du profil sécrétoire des adipocytes, ce qui conduit à une limitation de l'angiogenèse, une surproduction de MEC, une inflammation chronique locale, et ainsi à un dysfonctionnement métabolique du TA obèse (**Figure 12**).



**Figure 12 : Hypertrophie et hypoxie adipocytaires au cours de l'obésité**

(D'après : (Sun et al., 2011))

(Au cours du développement pathologique du TA, l'hypertrophie adipocytaire associée à une limitation de l'angiogenèse peut induire une hypoxie tissulaire. Par conséquent, l'activation du gène HIF-1 $\alpha$  entraîne l'induction d'un programme fibro-inflammatoire qui est associé à la résistance à l'insuline).

#### *II.D.4.c. Microbiote intestinal, LPS et TLR*

Par ailleurs, l'intestin joue un rôle important dans l'obésité et ses comorbidités associées. En effet, le tube digestif est rapidement impacté par les modifications de régimes alimentaires. Or, il est considéré comme le deuxième cerveau chez l'humain et sécrète beaucoup d'hormones régulant la prise alimentaire. La flore microbienne intestinale contient 3 à 4.10<sup>14</sup> bactéries (Sender et al., 2016), a un métagénome 150 à 200 fois plus important que celui du génome humain, et joue un rôle crucial dans l'homéostasie de l'organisme. Les bactéries symbiotiques colonisant le tractus gastro-intestinal humain sont impliquées dans la régulation de plusieurs aspects de l'équilibre énergétique, y compris la satiété, la dépense d'énergétique, le stockage des graisses et l'extraction des calories de l'alimentation (Khan et al., 2014; Rosenbaum et al., 2015). Ainsi, la flore intestinale peut induire une altération de la prise de poids, de l'inflammation et de l'insulinorésistance. Or, le système immunitaire est à l'interface entre les modifications de la flore intestinale et les modifications du métabolisme (Belkaid and Hand, 2014; Winer et al., 2016).

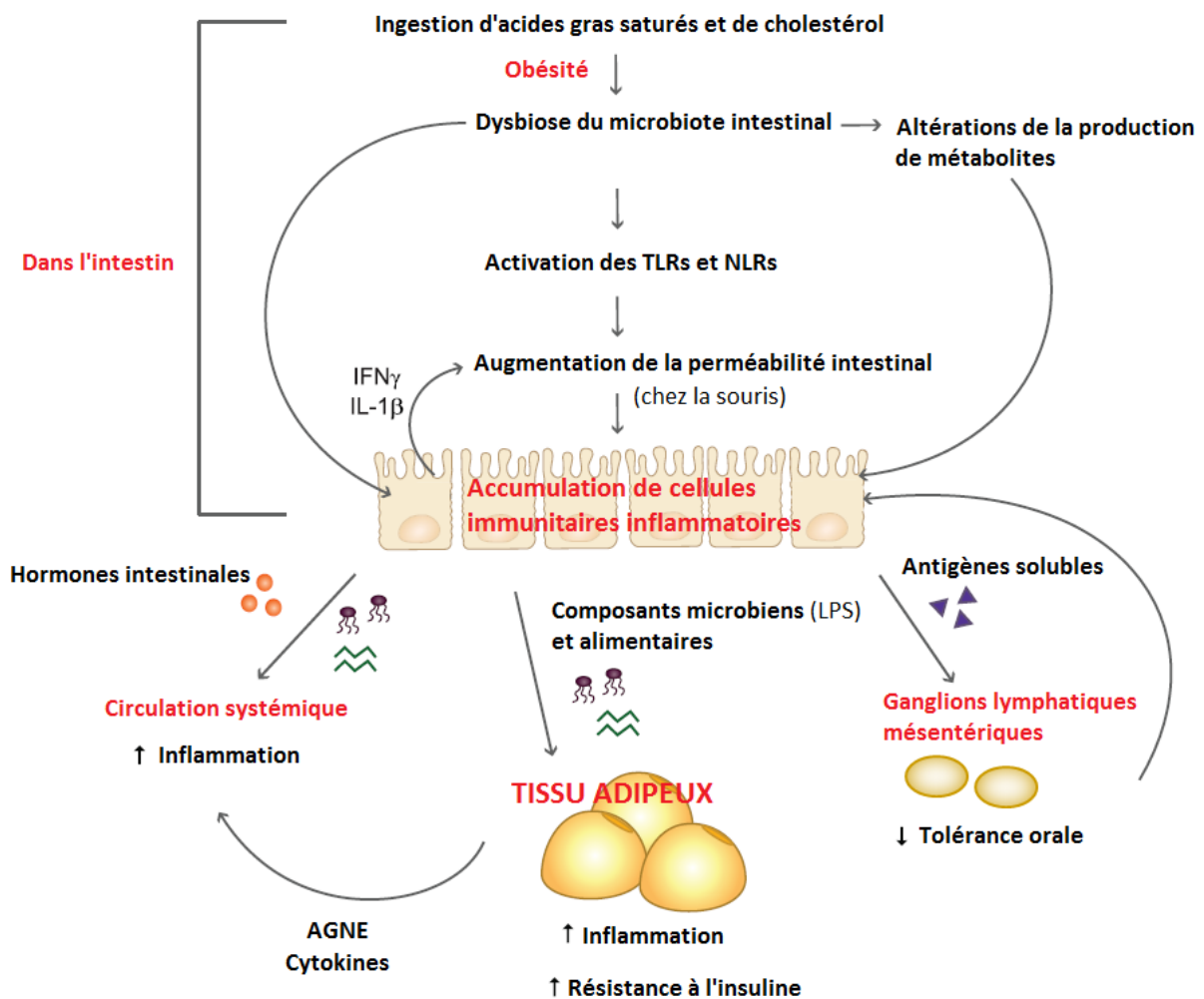
Une des premières études montrant une relation entre le microbiote intestinal et l'obésité a été réalisée dans des souris axéniques (sans flore intestinale et étudiées dans un environnement sans germes), qui soumises à un régime HFD grossissaient moins que des souris conventionnelles (Bäckhed et al.,

2004). De plus, ce même groupe a démontré que des souris axéniques colonisées par une flore intestinale provenant de souris obèses prenaient plus de poids que des souris axéniques colonisées avec une flore provenant de souris minces (Turnbaugh et al., 2006). Ensuite, il a été montré que l'obésité était associée à une dysbiose intestinale avec une plus faible diversité du microbiote intestinal, que ce soit chez la souris (Turnbaugh et al., 2008) ou chez l'humain (Cotillard et al., 2013; Le Chatelier et al., 2013; Turnbaugh et al., 2009). Finalement, bien que le microbiote intestinal induise probablement une inflammation du TA de façon indirecte, par des effets sur la prise poids, de récentes études suggèrent également un impact direct des bactéries. En effet, plusieurs données *in vivo* ont impliqué des « motifs moléculaires associés aux pathogènes » (PAMPs) dérivés du microbiote comme déclencheurs de l'inflammation du TA obèse. Il a été montré que les taux circulants de LPS sont modérément élevés chez des souris obèses comparés à des souris minces, phénomène qui a été décrit sous le nom « d'endotoxémie métabolique » (les taux de LPS sont 10 à 50 fois plus faibles que ceux mesurés lors d'une infection bactérienne) (Cani et al., 2007). De plus, une infusion de LPS à des souris minces induit une insulino-résistance et une prise de poids démontrant le rôle causal de cette endotoxémie métabolique (Cani et al., 2007). A l'inverse, le traitement de souris obèses avec des antibiotiques aboutit à une diminution des niveaux de LPS et de l'expression du TNF- $\alpha$  dans l'intestin, ce qui s'accompagne d'une diminution du poids et des taux d'insuline au niveau systémique ainsi que d'une amélioration de la tolérance au glucose (Cani et al., 2008; Membrez et al., 2008). Cette endotoxémie métabolique a été retrouvée chez des individus à risque de développer des maladies métaboliques, en particulier ceux consommant une alimentation riche en graisses (Amar et al., 2008; Laugerette et al., 2011). La capacité du LPS dérivé du microbiote à induire l'inflammation du TA a été testée chez des souris axéniques mono-colonisées avec des bactéries *Escherichia coli* sauvages ou avec une autre souche exprimant un variant du LPS moins immunogénique. Dans cette étude, il a été montré que l'immunogénicité du LPS n'est pas un critère pour l'induction d'une prise de poids mais par contre est nécessaire à l'accumulation macrophagique dans le TA (Caesar et al., 2012). De façon semblable, une récente étude du même groupe a montré que l'inflammation du TA induite par le microbiote intestinal résulte principalement du type d'acides gras ingérés (Caesar et al., 2015). En effet, des souris axéniques nourries avec du lard ont une faible accumulation macrophagique dans le TA comparées aux souris sauvages nourries avec le même régime. Or, l'induction des effets inflammatoires par un régime riche en AGS requière à la fois la signalisation des TLR et le microbiote intestinal. Enfin, la transplantation fécale du microbiote de souris nourries par un régime riche en acides gras polyinsaturés dans des souris nourries par un régime riche en AGS limite l'inflammation du TA.

En outre, des études chez la souris ont montré une diminution des Th17 dans l'intestin des souris obèses mais une augmentation dans le TA (Cavallari et al., 2016; Garidou et al., 2015). Par contre, chez l'humain, il a été montré que l'intestin des individus obèses est plus inflammatoire, avec

notamment plus d'IL-17 et d'IL-22, que celui des individus minces, ce qui diminue la sensibilité à l'insuline dans les entérocytes (Monteiro-Sepulveda et al., 2015). Pour finir, il a été observé chez la souris obèse une augmentation de la perméabilité intestinale bien que pour l'instant ce phénomène ne soit pas encore confirmé chez les individus obèses (Genser et al., 2016).

Finalement, ces données suggèrent que la dysbiose du microbiote intestinal induite par l'alimentation influe considérablement l'inflammation du TA (**Figure 13**), bien que les mécanismes ne soient pas totalement élucidés et qu'il existe des différences entre les modèles murins et la physiopathologie humaine. Cependant, des interventions nutritionnelles ou thérapeutiques visant à prévenir ou à corriger les anomalies de compositions du microbiote pourraient constituer de nouvelles approches thérapeutiques contre les complications de l'obésité.



**Figure 13 : Processus physiopathologiques de l'axe intestin-tissu adipeux**

(D'après : (Winer et al., 2016))

(L'ingestion d'AGS et de cholestérol conduit à une dysbiose du microbiote intestinal avec par exemple une diminution des espèces bactériennes qui produisent des métabolites ayant des propriétés anti-inflammatoires, ce qui induit une augmentation des cellules immunitaires inflammatoires dans l'intestin. En outre, ces changements microbiens peuvent déclencher l'inflammation directement *via* l'activation des TLR et des NLR (Récepteur de type NOD). Or, la sécrétion accrue de médiateurs pro-inflammatoires fragilise la barrière intestinale, ce qui augmente la perméabilité intestinale (cela n'a pas encore été démontré chez les individus obèses). Ainsi, la « fuite » d'antigènes solubles diminue les réponses tolérogènes dans les ganglions lymphatiques mésentériques, ce qui favorise à son tour une réponse inflammatoire dans l'intestin. En outre, l'inflammation de l'intestin peut modifier les taux d'hormones produites par les cellules intestinales, ce qui affecte la diminution de la glycémie. Pour finir, la « sortie » des composants microbiens et alimentaires induit une inflammation chronique au niveau systémique mais également dans le TA, dans lequel il va y avoir une accumulation de cellules immunitaires, une résistance à l'insuline et un relargage accru d'AGNE. Ensemble, l'inflammation de l'intestin induit par un régime gras interagit avec plusieurs organes ce qui aggrave les comorbidités associées à l'obésité).

### **II.D.3. Conséquences locales de l'inflammation chronique**

#### *II.D.3.a. La résistance à l'insuline et les voies inflammatoires*

Le TA est l'un des tissus cibles majeurs de l'insuline, qui stimule le stockage des TG dans les adipocytes. Pour cela, l'insuline agit par des mécanismes multiples favorisant l'adipogenèse et la lipogenèse et, au contraire, inhibant la lipolyse (Kahn and Flier, 2000). Les effets métaboliques de l'insuline sont médiés par un réseau complexe de signalisation (non détaillé ici). Au cours de l'obésité, différents acteurs tels que les acides gras, certains métabolites (céramides, diacylglycérol), le stress du RE, ainsi que des cytokines pro-inflammatoires contribuent à altérer la signalisation de l'insuline. Différentes voies de signalisation impliquant entre autres plusieurs kinases (PKC, MAPK, JNK), la voie NF- $\kappa$ B (facteur nucléaire  $\kappa$ B), et l'inflammasome relaient les effets délétères de ces facteurs (Schenk et al., 2008). A terme, une résistance à l'insuline entraîne une dérégulation de la glycémie conduisant au DT2 (Guilherme et al., 2008).

La plupart des facteurs pro-inflammatoires augmentés dans le TA obèse tels que le TNF- $\alpha$  (Ruan and Lodish, 2003; Stephens et al., 1997), l'IL-6 (Lagathu et al., 2003; Rotter et al., 2003), l'IFN- $\gamma$  (McGillicuddy et al., 2009) et l'IL-1 $\beta$  (Jager et al., 2007; Lagathu et al., 2006) peuvent induire une résistance à l'insuline dans les adipocytes. Ces molécules sont connues pour interférer avec la signalisation de l'insuline en activant les protéines sérine/thréonine kinases. Cela comprend notamment les kinases JNK1 et IKK $\beta$  qui inhibent la phosphorylation de la tyrosine d'IRS-1 induite par l'insuline en augmentant la phosphorylation de la sérine (Gao et al., 2002; Tanti and Jager, 2009). De plus, les kinases régulent également les programmes de transcription en aval d'AP-1 et de NF- $\kappa$ B, entraînant l'augmentation de l'expression et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les adipocytes, ce qui crée ainsi une boucle d'insulinorésistance et d'inflammation (de Luca and Olefsky, 2008). Or, la résistance à l'insuline adipocytaire inhibe son effet lipogénique et au contraire induit une lipolyse accrue conduisant à l'augmentation du contenu d'ANGE dans le TA, ce qui augmente encore l'insulinorésistance, mais également le dépôt ectopique d'acides gras créant ainsi un lipotoxicité hépatique, pancréatique, cardiaque (Attie and Scherer, 2009; Schaffer, 2003).

Or, différentes voies de l'inflammation sont impliquées dans la résistance à l'insuline.

#### *La voie NF- $\kappa$ B-IKK $\beta$*

La voie NF- $\kappa$ B, qui est principalement activée par les TLR (Beutler, 2009), joue rôle essentiel dans la régulation de l'inflammation (Ghosh et al., 2012; Oeckinghaus et al., 2011). Or, de nombreux gènes cibles de NF- $\kappa$ B tels que le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et CCL2 sont impliqués dans l'inflammation du TA et la résistance à l'insuline induite par l'obésité. De plus, chez les animaux obèses, l'activité de NF- $\kappa$ B est augmentée (Kim et al., 2001), principalement par l'activation des TLR (Holland et al., 2011; Lee et al., 2001; Shi et al., 2006). Or, l'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B par des inhibiteurs pharmacologiques de IKK $\beta$  (dose élevée d'aspirine ou salicylates), ou par la délétion de IKK $\beta$ , améliore la résistance à

l'insuline induite par un régime HFD (Kim et al., 2001; Yuan et al., 2001). Plus important encore, chez des individus insulino-résistants ou DT2, les inhibiteurs pharmacologiques de IKK $\beta$  diminuent l'activité de NF- $\kappa$ B dans leurs cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMCs) et améliore leur contrôle glycémique (Fleischman et al., 2008; Goldfine et al., 2008, 2010; Hundal et al., 2002). Ces résultats suggèrent fortement que la suppression de l'inflammation induite par la voie NF- $\kappa$ B-IKK $\beta$  peut être un traitement futur pour l'insulinorésistance induite par l'obésité.

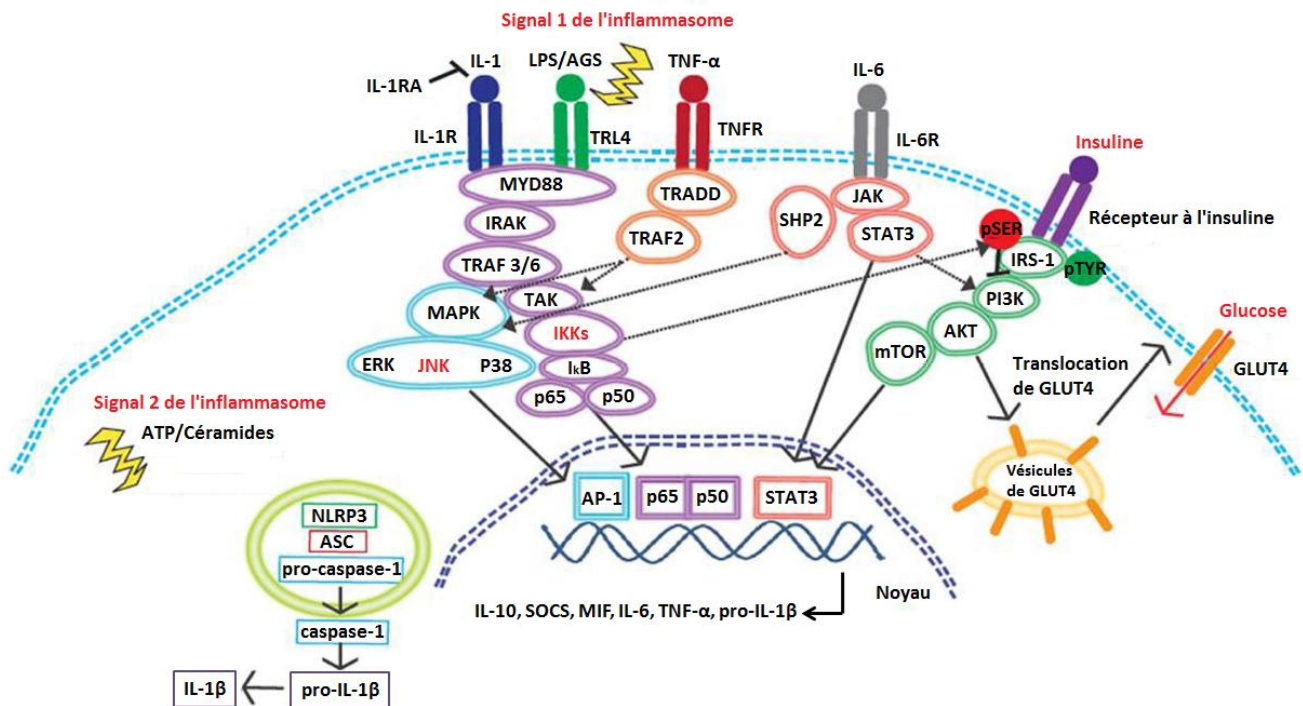
#### *La voie Jun N-terminal kinases (JNK)*

Les protéines kinases JNK appartiennent à la famille des MAP kinases et sont impliquées dans de nombreuses voies de stress (Bogoyevitch et al., 2010; Solinas and Karin, 2010). En effet, JNK est connue pour jouer un rôle clé dans le stress du RE qui induit l'inflammation et inhibe la sensibilité à l'insuline (Hotamisligil, 2010). Dans le TA, l'activation de JNK peut avoir lieu dans les cellules hématopoïétiques (Solinas et al., 2007), notamment dans les cellules myéloïdes (Han et al., 2013), mais également dans les cellules non-immunitaires (Vallerie et al., 2008) en particulier dans les adipocytes (Sabio et al., 2008). Or, la suppression de JNK améliore la résistance à l'insuline induite par l'obésité (Hirosumi et al., 2002; Jaeschke et al., 2004).

#### *L'inflammasome*

L'inflammasome est un complexe protéique oligomérique impliqué dans l'immunité innée (Strowig et al., 2012), notamment présent dans les cellules immunitaires myéloïdes et constitué entre autres de NRLPs, NALPs, ASC, Pycard et caspase 1. Sa fonction principale est d'induire la maturation de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-18 et donc de produire ces cytokines en réponse aux signaux de danger. Par conséquent, l'inflammasome ne peut être pleinement activé que lorsque que deux événements de signalisation se produisent, tout d'abord l'augmentation de l'expression et de la production de la pro-IL-1 $\beta$  et de la pro-IL-18 (principalement induite l'activation des TLR et de la voie NF- $\kappa$ B), puis par l'activation de l'inflammasome afin qu'elle clive la pro-IL-1 $\beta$  et la pro-IL-18 *via* l'activité caspase 1 (principalement induite par des PAMPs et des DAMPs) (Davis et al., 2011). Or, il a été montré *in vitro* que les AGNE ou les céramides peuvent activer l'inflammasome dans des macrophages stimulés avec du LPS (Vandanmagsar et al., 2011; Wen et al., 2011). De plus, trois études ont montré que la suppression d'éléments de l'inflammasome tels que NLRP3, PYCARD, caspase-1, ou l'ASC, induit une diminution de l'inflammation du TA obèse avec une diminution des macrophages inflammatoires et améliore la sensibilité à l'insuline (Stienstra et al., 2011a; Vandanmagsar et al., 2011; Wen et al., 2011). En outre, c'est l'activation de l'inflammasome dans les macrophages qui médierait les effets délétères dans le TA (Wen et al., 2011). Par contre, il n'est pas encore clair si cette activation de l'inflammasome dans le TA au cours de l'obésité régule l'inflammation et la résistance de façon directe ou indirecte suite à la prise de poids.

Finalement, plusieurs voies d'activation de l'inflammation et de la résistance à l'insuline peuvent être activées au cours de l'obésité, que ce soit dans les adipocytes ou les autres cellules du TA (**Figure 14**).



**Figure 14 : Voies d'activation de l'inflammation et de la résistance à l'insuline**

(D'après : (McArdle et al., 2013))

(Les voies de signalisation activées par les AGS ou par des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 ou le TNF- $\alpha$  déclenchent une cascade d'événements qui favorise la libération de molécules inflammatoires et induit une résistance à l'insuline. En effet, l'activation des voies NF- $\kappa$ B et MAPK (Mitogen-activated protein kinases) entraîne la translocation de facteurs de transcription dans le noyau, l'activation de la transcription et la production de cytokines. De plus, cela entraîne la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par un procédé en deux temps : d'abord l'induction du gène pro-IL-1 $\beta$ , puis l'activation de l'inflammasome NLRP3 par l'ATP ou les céramides provoquant le clivage de la pro-IL-1 $\beta$  en IL-1 $\beta$  *via* la caspase-1. En outre, les voies IKK $\beta$  et JNK peuvent promouvoir la phosphorylation d'une sérine sur le récepteur à l'insuline IRS-1, qui dans un état insulinosensible est phosphorylée sur une tyrosine, ce qui est associée à la résistance à l'insuline et réduit ainsi l'absorption du glucose).



### *II.D.3.b. La fibrose du tissu adipeux*

La fibrose est la formation d'un excès de tissu conjonctif fibreux dans un organe lors d'un processus de réparation tissulaire. Cela peut être un état réactif, bénin, ou pathologique. En réponse à une blessure, le processus de réparation tissulaire est nommé cicatrisation. Le processus fibrotique induit un dépôt excessif de tissu conjonctif qui peut effacer l'architecture et la fonction de l'organe ou du tissu sous-jacent et ainsi induire un état pathologique. La fibrose est similaire au processus de cicatrisation, les deux phénomènes impliquent une stimulation de différents types cellulaires qui génère du tissu conjonctif en produisant des collagènes. Parmi ces cellules il y a les fibrocytes dérivés de la moelle osseuse, les cellules épithéliales, les péricytes, les cellules endothéliales et les fibroblastes. La stimulation de ces cellules résulte généralement de la sécrétion constitutive de facteurs solubles par des cellules immunitaires telles que les macrophages. Le médiateur profibrotique le plus étudié et le mieux caractérisé est le TGF (facteur de croissance transformant)- $\beta$ , notamment le TGF- $\beta$ 1 (Ask et al., 2008). De nombreux modèles animaux ont démontré un rôle important du TGF- $\beta$  dans la pathogénie fibrotique (Biernacka et al., 2011; Leask and Abraham, 2004; Pohlers et al., 2009). Par exemple, l'inhibition du TGF- $\beta$  atténue la fibrose hépatique, rénale et cardiaque dans divers modèles animaux (Nakamura et al., 2000; Teekakirikul et al., 2010). D'autres médiateurs solubles de la fibrose sont également importants, comme le CTGF, le FG dérivé des plaquettes (PDGF) et l'IL-4. Ceux-ci déclenchent différentes voies de signalisation telles que la voie AKT/mTOR (Mitra et al., 2015) et la voie SMAD (Leask and Abraham, 2004) induisant ainsi la prolifération et l'activation des fibroblastes, ce qui génère un excès de MEC autour du tissu conjonctif.

Or, dans le TA, les adipocytes sont incorporés dans un réseau dense de MEC (Chun et al., 2006; Napolitano, 1963). Ce sont principalement les fibroblastes, les pré-adipocytes et les cellules endothéliales qui apportent une fonction de soutien mécanique au tissu en régulant le renouvellement de la MEC grâce à la synthèse de fibres et de collagènes, ainsi que leur dégradation *via* la sécrétion de métalloprotéinases matricielles (MMPs). La MEC fonctionne non seulement comme support mécanique du TA, mais régule aussi les événements physiologiques et pathologiques du remodelage tissulaire *via* de nombreuses voies de signalisation (Khan et al., 2009).

Ainsi, au cours de l'obésité il y a un remodelage actif de la MEC afin de répondre à l'expansion du TA, avec une augmentation de nombreux composants de cette MEC (Divoux et al., 2010; Khan et al., 2009; O'Hara et al., 2009). A terme, un état fibrotique se met en place, ce qui limite la plasticité du tissu. Cette fibrose est une caractéristique clé d'un TA métaboliquement dysfonctionnel. Par exemple, le collagène de type VI, qui est fortement augmenté dans le TA obèse, est corrélé à l'hyperglycémie et la résistance à l'insuline (Berria et al., 2006; Muona et al., 1993). Or, une étude a montré que la délétion du gène COLVI induit des améliorations de la survie et du métabolisme adipocytaire (Khan et al., 2009). La MEC du TA est régulée par des MMPs, une famille des endopeptidases neutres, qui clivent ses composants permettant ainsi le remodelage accru de la MEC. Certaines MMPs sont

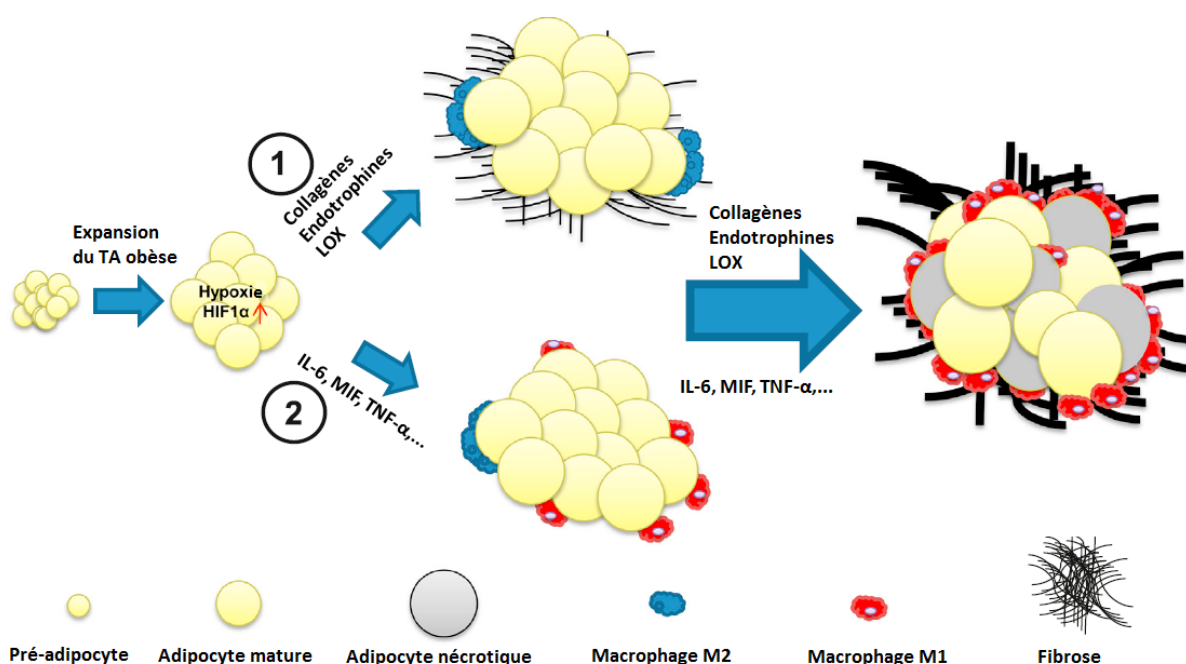
augmentées au cours de l'obésité telles que les MMP3, -11, -12, -13 et -14, tandis que d'autres sont diminuées comme les MMP7, -9, -16 et -24 (Maquoi et al., 2002). En parallèle, les inhibiteurs spécifiques des MMPs (TIMPs) peuvent également être dérégulés dans le TA obèse. Plus précisément, TIMP1 est augmenté et inversement TIMP4 est inhibé (Maquoi et al., 2002). Ces différentes régulations des MMPs et des TIMPs suggèrent leur rôle important dans la physiopathologie du TA. De plus, certaines MMPs ont d'autres impacts importants comme il a été montré avec la MMP14 qui régule directement la différenciation adipocytaire *in vitro* et *in vivo* (Chun et al., 2006). Ainsi l'absence de MMP14 altère le développement du TA et peut provoquer une lipodystrophie (Chun et al., 2006). Cependant, les différentes fonctions des MMPs doivent encore être identifiées dans le TA.

Dans le TA, il existe un lien étroit entre l'inflammation, la production de la MEC et le développement de la fibrose, or il a été montré que le récepteur TLR4 agit comme un régulateur clé dans la fibrogenèse (Poggi et al., 2007; Saberi et al., 2009; Shi et al., 2006; Vila et al., 2014). Une étude chez la souris avec une inhibition du TLR4, au niveau génétique ou pharmacologiquement, a montré que ce récepteur d'endotoxine est essentiel pour le développement de la fibrose du TA. Des expériences de transfert de moelle osseuse, de déplétion des macrophages par le clodronate et l'administration de LPS ont montré que l'activation des macrophages par le TLR4 est essentielle dans le développement de la fibrose du TA, et que ce processus implique le facteur pro-fibrotique TGF- $\beta$ 1 (Vila et al., 2014). Or, les membres de la famille TGF- $\beta$  sont principalement produits par les macrophages dans le TA et induisent une réaction fibrotique en ciblant principalement les cellules pré-adipocytes et les cellules endothéliales (Bourlier et al., 2012; Keophiphath et al., 2009; Reggio et al., 2016). De plus, par l'intermédiaire des molécules mécanosensibles en partie stimulées par la déformation de cellulaire, la fibrose peut affecter négativement la fonction des adipocytes humains, en particulier en induisant une sécrétion accrue de molécules inflammatoires et l'expression de facteurs pro-fibrotiques (Pellegrinelli et al., 2014b).

Ainsi, l'accumulation excessive de collagènes et le développement d'une fibrose peuvent limiter l'expandabilité du TA, ce qui conduit à une inflammation et aux dépôts lipidiques ectopiques. Cependant, une nouvelle étude a montré que l'inhibition de macrophages pro-inflammatoires induit une accumulation de macrophages anti-inflammatoires et l'augmentation de la fibrose dans le TA viscéral, ce qui limite l'hypertrophie adipocytaire et induit une accumulation lipidique dans le TA sous-cutané, ce qui est bénéfique pour la sensibilité à l'insuline (Dalmas et al., 2015; Divoux et al., 2010). En outre, après une perte de poids induite par chirurgie bariatrique, il a été montré que le TA sous-cutané subit un important remodelage de la MEC avec une dégradation des collagènes et surtout une diminution de leur réticulation (ou rigidité) (Liu et al., 2016). De manière intéressante, une des options thérapeutiques anti-fibrosantes prometteuse est l'utilisation d'agonistes de PPAR $\gamma$ . En effet, il a été montré que PPAR $\gamma$  est impliqué dans la régulation de la biologie vasculaire, de l'inflammation et de la fibrose et module directement la signalisation du TGF- $\beta$ . Or, des agonistes de PPAR $\gamma$  tels que la

rosiglitazone améliorent l'hépatite induite par la *Schistosoma* ainsi que la fibrose induite par la bléomycine dans des modèles murins (Chen et al., 2008; Wu et al., 2009).

Finalement, la fibrose du TA joue un rôle important dans la dynamique du remodelage tissulaire, dans le maintien de l'inflammation ainsi que dans les altérations métaboliques mais les mécanismes de sa mise en place et de sa régulation sont très complexes et encore peu connus dans le contexte de l'obésité (**Figure 15**).



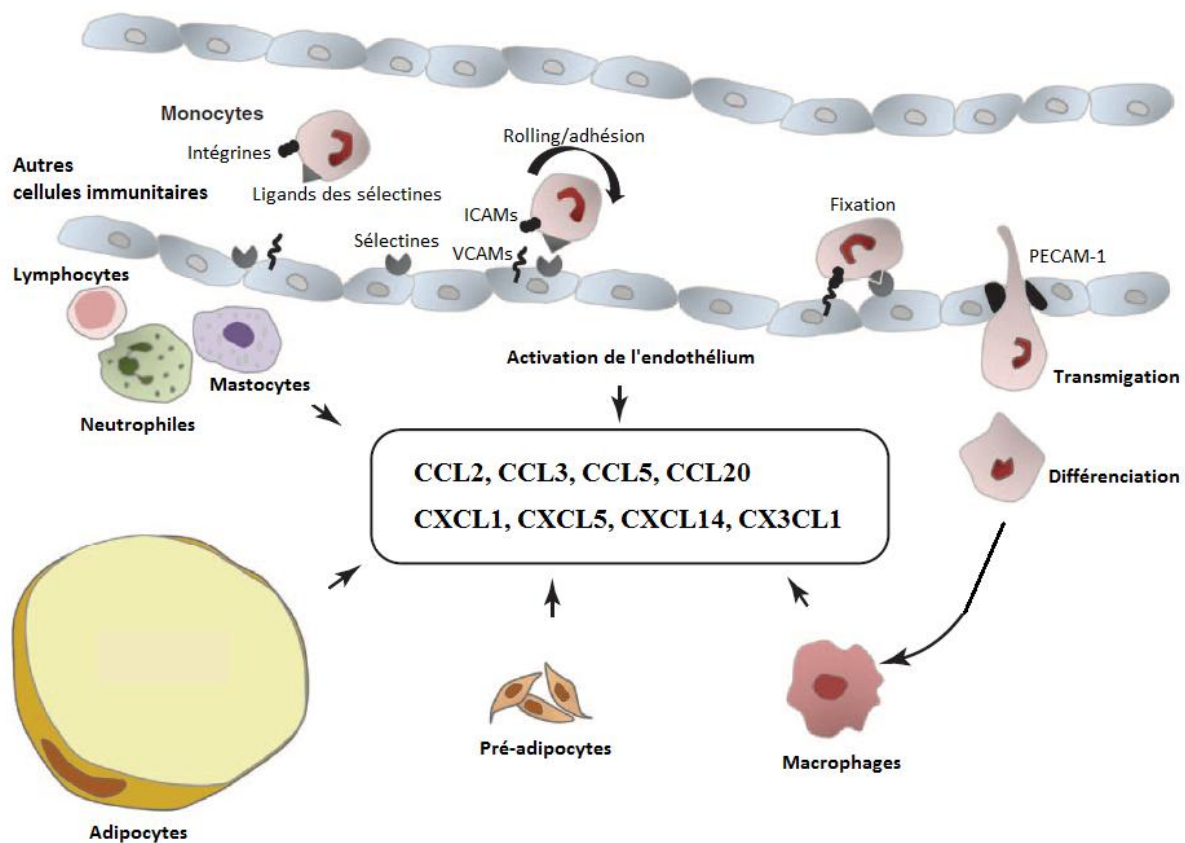
**Figure 15 : Deux théories sur les étapes séquentielles menant à la fibrose du tissu adipeux obèse**

(d'après : (Sun et al., 2013))

(Comme je l'ai décrit précédemment, l'expansion du TA au cours de l'obésité peut conduire à un état hypoxique et par conséquent induire l'expression du gène HIF-1 $\alpha$  qui entraîne un état fibro-inflammatoire. Cependant, les étapes séquentielles menant à la fibrose et à l'inflammation ne sont pas encore totalement élucidées. (1) Soit il y a d'abord l'induction d'une série de gènes fibrotiques tels que les collagènes et la LOX qui conduisent à la mise en place d'une fibrose, ce qui induit une nécrose adipocytaire et finalement une accumulation de cellules immunitaires. (2) Soit HIF-1 $\alpha$  induit directement des facteurs pro-inflammatoires tels que l'IL6 et MIF (Macrophage migration inhibitory factor) qui induisent une infiltration de cellules immunitaires puis la mise en place de la fibrose. Dans les deux cas, l'accumulation excessive de MEC semble être délétère pour le bon fonctionnement du TA).

### *II.D.3.c. Les chimiokines du tissu adipeux*

Les chimiokines jouent un rôle majeur dans le recrutement sélectif des différentes cellules immunitaires par chimiotactisme sur les sites infectieux ou inflammatoires (Bromley et al., 2008; Griffith et al., 2014). Or, au cours de l'obésité les TA sous-cutané et viscéral expriment plus fortement un grand nombre de chimiokines (Huber et al., 2008). La chimiokine CCL2 (ou MCP-1 monocyte chemoattractant protein 1) est l'une des chimiokines clés qui régulent la migration et l'infiltration des monocytes dans le TA obèse (Deshmane et al., 2009; Fain, 2010). Bien que les cellules sécrétrices majoritaires de CCL2 soient les cellules immunitaires, il a récemment été décrit que la sécrétion de CCL2 par les adipocytes pouvait induire un recrutement monocyttaire indépendamment de la sécrétion de CCL2 pour les autres types cellulaires du TA (Meijer et al., 2011). En plus de CCL2, de nombreuses autres chimiokines sont augmentées dans le TA au cours de l'obésité, telles que CCL3, CCL5, CCL20, CXCL1, CXCL5, CXCL14 et CX3CL1, qui jouent un rôle important dans le recrutement de cellules immunitaires et dans la résistance à l'insuline (Chavey et al., 2009; Duffaut et al., 2009a; Keophiphath et al., 2010; Nara et al., 2007; Shah et al., 2011) (**Figure 16**). Il a également été montré que la plupart de ces chimiokines peuvent être induites par des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  dans des adipocytes 3T3-L1 et que leur activation est essentiellement dépendante de NF- $\kappa$ B (Tourniaire et al., 2013). En outre, l'expression des récepteurs spécifiques de ces chimiokines est aussi augmentée dans le TA obèse, ce qui suggère que les cellules cibles de ce chimiotactisme sont bien arrivées sur le site inflammatoire (Huber et al., 2008). Ainsi l'augmentation de toutes ces chimiokines en même temps au cours de l'obésité va contribuer à induire un fort recrutement de cellules immunitaires au sein du TA, ce qui va perpétuer l'inflammation chronique et les conséquences pathologies associées.



**Figure 16 : Acteurs cellulaires et chimiokines impliqués dans le recrutement de cellules immunitaires dans le tissu adipeux au cours de l'obésité**

(d'après : (Dalmas et al., 2011b))

(Au cours de l'obésité, les adipocytes hypertrophiques, les pré-adipocytes ainsi que les cellules immunitaires produisent un large panel de cytokines pro-inflammatoires et de métabolites qui participent à l'activation de l'endothélium. Ainsi, les cellules endothéliales produisent plus de molécules d'adhésion cellulaire, telles que les sélectines, qui participent à l'entrée des cellules immunitaires dans le TA. De plus, toutes les cellules du TA peuvent sécréter de nombreuses chimiokines, dont la quantité augmente au cours de l'obésité, ce qui induit également un recrutement accru de cellules immunitaires. Il y a donc un cercle vicieux qui s'installe entre l'accumulation et le recrutement de cellules immunitaires dans le TA obèse).

### **III. Cellules immunitaires du tissu adipeux**

Le système immunitaire est un système composé de nombreuses structures et processus biologiques au sein d'un organisme qui protège contre les infections et les maladies. Pour fonctionner correctement, un système immunitaire doit détecter une grande variété d'agents pathogènes, tels que les virus, les vers parasites, les bactéries, et les distinguer de ses propres tissus sains. Afin de s'adapter à l'évolution des pathogènes, le système immunitaire multiplie les différents mécanismes de défense avec plusieurs strates de réponse et une variété de cellules. Ainsi, chez plusieurs espèces, dont l'humain, le système immunitaire induit des réponses très vastes et peut être classé en deux grandes parties, le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif. Un dysfonctionnement du système immunitaire peut entraîner des maladies auto-immunes, des maladies inflammatoires chroniques et certains cancers (O'Byrne and Dalgleish, 2001). Ainsi, au cours de ces 10 dernières années, il a été mis en évidence l'accumulation de nombreux types de cellules immunitaires au sein du TA obèse induisant des conséquences pathologiques ou bénéfiques sur l'inflammation chronique de bas grade et sur les comorbidités associées à l'obésité (Hotamisligil, 2006).

#### **III.A. Les cellules de l'immunité innée**

L'immunité innée regroupe les cellules et les mécanismes permettant la défense de l'organisme contre les agents infectieux de façon immédiate et non spécifique.

##### **III.A.1. Les macrophages**

En tant que cellules « professionnelles » de la phagocytose, les macrophages sont extrêmement compétents dans l'élimination de nombreuses molécules, comme les débris cellulaires, les pathogènes et les petits lipides (Gordon, 1995).

##### *III.A.1.a. Accumulation macrophagique dans le tissu adipeux obèse*

En 2003, pour la première fois, il a été montré que TA obèse, murin et humain, subissait une accumulation de cellules immunitaires, précisément de macrophages, de façon proportionnelle à l'adiposité et associée à l'inflammation et à la résistance à l'insuline (Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003). Cette accumulation macrophagique est plus importante dans le TA viscéral que dans le TA sous-cutané (Bruun et al., 2005), ce qui concorde avec le fait que le TA viscéral est plus fortement associé aux complications métaboliques. De nombreuses études ont par la suite confirmé l'importance de ces cellules dans la production de cytokines inflammatoires et dans l'insulinorésistance (McNelis and Olefsky, 2014). Des macrophages sont présents dans le TA mince mais leur prévalence augmente lorsque le TA se développe et corrèle positivement avec l'IMC et l'hypertrophie adipocytaire (Vieira-Potter, 2014). Ainsi, chez la souris, il a été estimé que 5 à 15 % des cellules de la FSV d'un TA mince correspond à des macrophages, alors que cette proportion atteint 40 à 50 % dans un TA obèse

(McNelis and Olefsky, 2014). Chez l'humain, dans le TA viscéral, cela est plutôt de l'ordre de 4 % chez le mince et de 12 % chez l'obèse (Harman-Boehm et al., 2007). Or, la diminution de l'infiltration macrophagique ou l'ablation des macrophages réduit l'expression des cytokines inflammatoires dans le TA et améliore la sensibilité à l'insuline chez les souris HFD (Feng et al., 2011; Nara et al., 2007; Nomiyama et al., 2007; Weisberg et al., 2006).

#### *III.A.1.b. Mécanismes d'accumulation macrophagique*

L'accumulation macrophagique est principalement due à une infiltration monocyttaire (Nagareddy et al., 2014; Weisberg et al., 2003). Les mécanismes facilitant cette infiltration monocyttaire et leur activation sont multiples. Des signaux paracrines, autocrines et endocrines aussi bien que des modifications mécaniques telles que l'hypertrophie adipocytaire peuvent jouer un rôle dans de ces phénomènes. En effet, la production de nombreuses chimiokines comme le CCL2, le CCL3, le CCL5, le M-CSF ainsi que l'expression de leurs récepteurs respectifs sont augmentées au cours de l'obésité (Devèvre et al., 2015). L'augmentation des chimiokines telles que la CCL2 (ou MCP-1), sécrétée par les adipocytes hypertrophiques et les macrophages, joue un rôle physiopathologique dans la régulation de l'infiltration monocyttaire au sein du TA obèse grâce au récepteur CCR2 (Kanda et al., 2006; Weisberg et al., 2006). D'autres chimiokines sont augmentées au cours de l'obésité telles que CXCL14, MIP-1 $\alpha$ , MCP-2, MCP-3, CCL5 (ou RANTES), IL-8, CCL20, favorisant le recrutement de monocytes et de nombreux autres types cellulaires dans le TA obèse (Kanda et al., 2006; Nara et al., 2007; Xu et al., 2003). En outre, au cours de l'obésité, la nécrose adipocytaire, principalement induite par une hypertrophie incontrôlée, contribue au déclenchement de cette accumulation macrophagique. Il en résulte des amas de macrophages autour des adipocytes nécrotiques qu'on appelle les « structures en couronne » (CLSs) (Cinti et al., 2005; Giordano et al., 2013; Strissel et al., 2007). Ainsi, les macrophages vont fusionner pour phagocyter la gouttelette lipidique résiduelle, formant un grand syncytium multinucléé chargé en lipides qui est une caractéristique de l'inflammation chronique (Cinti et al., 2005; Lumeng et al., 2007a). De plus, les AGNE peuvent également servir de ligands pour le TLR4, activant ainsi la réponse inflammatoire et l'accumulation de macrophages dans les endroits où il y a des concentrations pathologiques de lipides extracellulaires (Nguyen et al., 2005; Shi et al., 2006; Suganami et al., 2005). Pour finir, comme je l'ai décrit précédemment, l'hypoxie tissulaire, dont les effets géniques sont relayés par le facteur de transcription HIF-1 $\alpha$ , est une cause classique d'attraction et de maintien des macrophages dans certaines tumeurs et dans les plaques d'athéromes, et pourrait également contribuer au recrutement des monocytes au sein du TA obèse. D'ailleurs, l'expression de HIF-1 $\alpha$  et de plusieurs de ses gènes cibles sont augmentées dans le TA obèse et diminuent après perte de poids (Cancello et al., 2005). Ces observations suggèrent que le TA obèse puisse présenter des zones hypoxiques favorisant localement l'expression de facteurs attractants, soit par un effet direct, soit indirectement *via* la surproduction locale de leptine dont le gène est inducible par HIF-1 $\alpha$  (Grosfeld et al., 2002; Guerre-Millo et al., 2002). Une étude, *in vitro*, suggère également

que la leptine favorise l'adhésion des monocytes sur les cellules endothéliales du TA (Curat et al., 2004). Des molécules d'adhésion, comme les sélectines et les intégrines, encore peu explorées dans le TA, peuvent aussi intervenir sur l'attraction macrophagique.

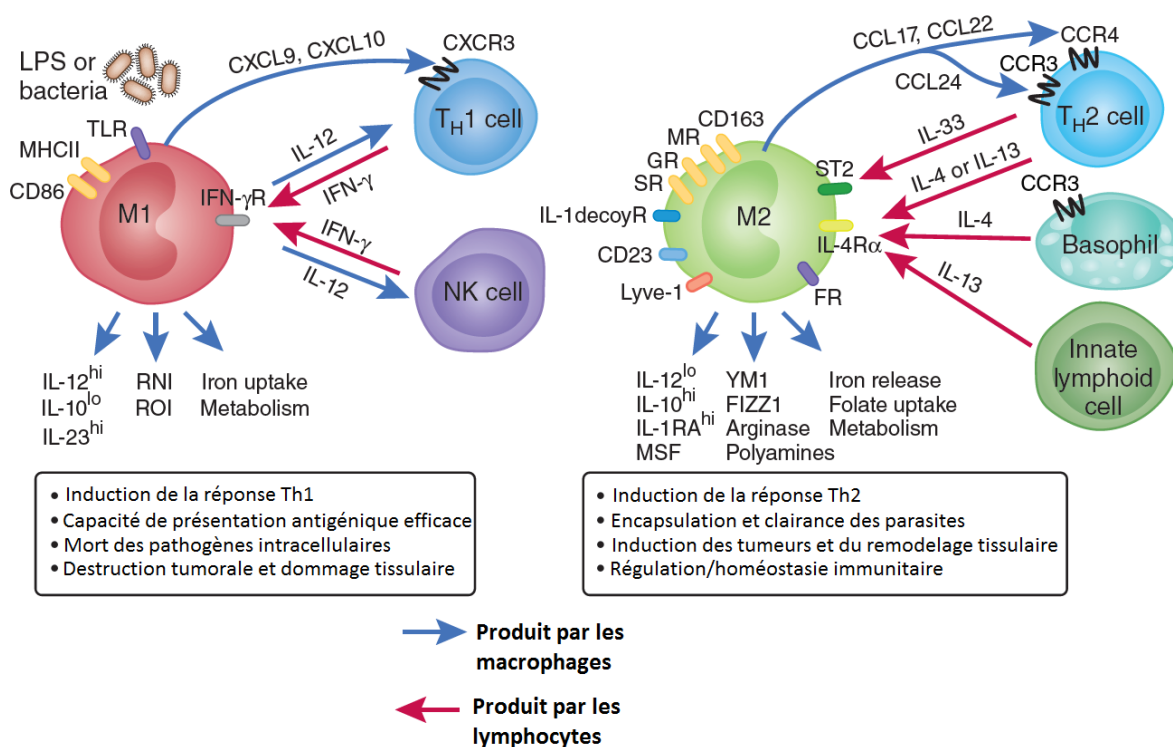
Cependant, plus récemment, d'autres mécanismes ont été décrits comme induisant cette augmentation macrophagique dans le TA au cours de l'obésité. Il a notamment été mis en évidence que les macrophages résidants subissaient une prolifération *in situ* (Amano et al., 2014; Zheng et al., 2016). Une étude a également démontré que le « signal de guidage neuro-immunitaire nétrine-1 », qui est fortement exprimé dans les macrophages du TA obèse et dont l'expression est augmentée par le palmitate, induit une rétention des macrophages dans le TA. En effet, Ramkhelawon et coll. ont montré que la délétion du gène NTN1 dans les cellules hématopoïétiques induit la « sortie » des macrophages du TA, réduit l'inflammation et améliore la sensibilité à l'insuline dans des souris sous HFD (Ramkhelawon et al., 2014). Pour finir, une récente étude a mis en évidence que le microenvironnement du TA obèse active métaboliquement les macrophages et induit l'expression de NF- $\kappa$ B, ce qui favorisent leur survie dans le TA au cours de l'obésité (Hill et al., 2015). L'ensemble de ces résultats indiquent que des mécanismes indépendants du recrutement monocyttaire jouent un rôle dans l'accumulation macrophagique dans le TA obèse. Ainsi, une meilleure compréhension des contributions relatives du recrutement, de la prolifération, de la rétention et de la survie dans le contrôle de la quantité des macrophages du TA obèse pourrait ouvrir la voie au développement de nouvelles thérapies contre les comorbidités associées à l'obésité.

#### *III.A.1.c. Polarisation pro-inflammatoire dans le tissu adipeux obèse*

Il existe plusieurs sous-populations de macrophages caractérisées par leurs phénotypes et leurs rôles immunitaires (Gordon and Taylor, 2005), qui sont polarisés en fonction du microenvironnement cytokinique entre autres (**Figure 17**). Or, dans le TA, en plus de leur nombre, le phénotype des macrophages est altéré au cours de l'obésité. En effet, il a été montré que dans le TA des souris minces les macrophages sont principalement de type M2 ou « alternativement activés », tandis qu'au cours de l'obésité il y a une accumulation des macrophages de type M1 ou « classiquement activés » (Lumeng et al., 2007b; Nguyen et al., 2007). Or, les macrophages M2, polarisés par l'IL-4 et l'IL13, deux cytokines principalement sécrétées par les lymphocytes T auxiliaires (Th) 2 et les ILC2, qui sont très exprimées dans le TA mince (Wu et al., 2011), produisent des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et sont associés à la réparation tissulaire et à la résolution de l'inflammation (Gordon, 2003). De plus, les macrophages peuvent être polarisés en M2 par l'adiponectine (Hui et al., 2015; Ohashi et al., 2010) qui diminue aussi au cours de l'obésité. En outre, il a été montré que les PPAR- $\gamma$  et  $\delta$  régulent la transcription de nombreux gènes des M2, comme l'arginase 1, le récepteur de mannose 1 et le récepteur antagoniste de l'IL-1 (IL-1Ra) (Kang et al., 2008; Odegaard et al., 2007, 2008). Or, les macrophages M2 préserve les fonctions métabolique et sécrétoire des adipocytes, favorisent la



réparation tissulaire et l'angiogenèse du TA, à l'état sain et au cours d'une perte de poids (Kosteli et al., 2010; Pini et al., 2016; Satriano, 2004). De plus, les macrophages M2 participent au remodelage du TA, y compris la clairance des adipocytes morts ou mourants, et le recrutement et la différenciation des progéniteurs adipocytaires (Lee et al., 2014a). Mais, au cours de l'obésité, l'augmentation de l'interféron (IFN)- $\gamma$ , principalement sécrété par les cellules NK et les Th1, et des produits bactériens tels que le LPS induit la polarisation des monocytes recrutés en macrophages M1 (Mosser and Edwards, 2008). Or les macrophages M1 produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  et l'IL-6, expriment l'oxyde nitrique synthase (iNOS) et produisent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Gordon, 2003). De plus, il a été montré que l'accumulation de lipides dans les macrophages du TA contribue à leur polarisation vers un état pro-inflammatoire (Prieur et al., 2011). Ainsi, il est suggéré les macrophages M2 servent à maintenir l'homéostasie du TA et la sensibilité à l'insuline, et qu'au cours de l'obésité l'augmentation des macrophages M1 favorisent l'inflammation et la résistance à l'insuline (Lumeng et al., 2007a; Odegaard and Chawla, 2011; Patsouris et al., 2008; Shoelson, 2006). Il a également été montré que cette accumulation de M1 dans le TA obèse pouvait contribuer à la stéatose hépatique (Kanda et al., 2006).



**Figure 17 : Conditions de polarisation des macrophages anti-inflammatoires de type M2 et pro-inflammatoire de type M1**

(d'après : (Biswas and Mantovani, 2010))

(Les monocytes sont polarisés en macrophages M1 pro-inflammatoires en présence d'IFN- $\gamma$  sécrété par les cellules NK et les lymphocytes Th1. Les monocytes sont polarisés en macrophages M2 anti-inflammatoires en présence d'IL-4, d'IL-13 et d'IL-33 sécrétés par les basophiles, les cellules lymphoïdes innées de type 2 et les lymphocytes Th2. FR, récepteur du folate (une vitamine B); GR, récepteur du galactose; IFN- $\gamma$ R, récepteur de l'IFN- $\gamma$ ; IL-1decoyR, récepteur « leurre » de l'IL-1; CMH-II, complexe majeur d'histocompatibilité de classe II; MR, récepteur du mannose; SR, récepteur scavenger; ST2, récepteur de l'IL-33; RNI, réactifs intermédiaires de l'azote; ROI, réactifs intermédiaires de l'oxygène).

### III.A.1.d. Les macrophages après perte de poids

Chez l'humain, après une perte de poids induite par la chirurgie bariatrique, il a été montré qu'au bout de trois mois le pourcentage de macrophages du TA sous-cutané diminue de façon importante, mais ne revient pas à l'état « mince », et qu'il y a une modulation de leur phénotype. De plus, cette diminution est associée à une réduction des profils pro-inflammatoires chez les individus obèses (Apovian et al., 2008; Canello et al., 2005; Clément et al., 2004; Harman-Boehm et al., 2007). Cependant, d'autres résultats montrent au contraire une accumulation macrophagique au cours de la phase précoce d'une perte de poids, probablement en raison de l'augmentation de la lipolyse du TA (Granneman et al., 2005; Kosteli et al., 2010; Pini et al., 2016), mais contrairement au phénomène observé au cours de l'obésité où il y a une accumulation chronique et permanente provoquant une inflammation du TA, le

recrutement est plus faible et transitoire. De plus, lors d'une perte de poids chronique, après 21 jours de restriction calorique, il y a une diminution progressive de la lipolyse et du nombre de macrophages dans le TA avec plus de macrophages M2 (Kosteli et al., 2010). Ainsi, l'afflux transitoire de macrophages dans le TA peut être une réponse physiologique saine mais devient pathologique et inflammatoire si cela devient chronique. En utilisant un modèle murin de lipoatrophie inductible, il a également été montré qu'une apoptose adipocytaire induit l'accumulation rapide de macrophages pour le remodelage du TA, par les mêmes mécanismes que ceux décrits après la nécrose adipocytaire (Pajvani et al., 2005).

Pour finir, chez l'humain il est difficile de distinguer les macrophages M1 et M2. Ils ont souvent un phénotype mixte exprimant à la fois des marqueurs de type M1 et de type M2 et produisant des cytokines pro- et anti-inflammatoires (Zeyda et al., 2007), ainsi peut être que seul le nombre de macrophages joue un rôle dans l'inflammation plutôt que leur phénotype qui est très large et « plastique ».

L'ensemble de ces résultats démontre que les macrophages sont vraisemblablement les cellules immunitaires majeures de l'homéostasie du TA mais également de l'inflammation chronique et des comorbidités associés à l'obésité. Cependant, il a été montré que la diminution du nombre de macrophages dans le TA de souris obèses n'induit pas une restauration complète de l'homéostasie glucidique et de la sensibilité à l'insuline ce qui suggère que d'autres cellules immunitaires peuvent avoir un rôle dans ce mécanisme.

### **II.A.2. Les cellules dendritiques**

En tant que cellules présentatrices d'antigènes (CPA) « professionnelles », les cellules dendritiques (DC) jouent un rôle fondamental dans la mise en place de la réponse immunitaire adaptative. En effet, de nombreuses études montrent que les DC sont à l'origine de la génération de différents types de réponses Th et de la mise en place de la mémoire immunitaire (Kapsenberg, 2003; Lanzavecchia and Sallusto, 2000). Il existe plusieurs sous-types de DC présentes dans les différents tissus et arborant des caractéristiques fonctionnelles bien distinctes (Ueno et al., 2010). En fonction des signaux activateurs qu'elles ont reçu, différentes réponses Th pourront être générées (Maldonado-López et al., 1999, 2001; Pulendran et al., 1999). Or, ces signaux peuvent être d'origines diverses, dont entre autres les facteurs inflammatoires présents dans le microenvironnement (Matzinger, 2002; Rescigno, 2002). Les DC sont donc des acteurs clés de l'immunité innée en favorisant l'accumulation de macrophages dans les sites inflammatoires et de l'immunité adaptative en présentant des antigènes aux lymphocytes T naïfs permettant ainsi leur différenciation en différentes sous-populations selon l'environnement cytokinique (Domínguez and Ardavín, 2010; Wu and Liu, 2007).

Dans le TA, l'identification des DC est compliquée car l'un de leurs antigènes principaux, le CD11c, est également fortement exprimé par les macrophages pro-inflammatoires M1 (Hashimoto et al., 2011). Cependant, dans le TA de souris obèse il a quand même été récemment montré une accumulation d'une population spécifique de cellules dendritiques CD11c<sup>high</sup>B220F4/80<sup>low</sup>. Cette population qui exprime le récepteur de la fractalkine, CX3CR1, est capable d'induire *in vitro* la différenciation de lymphocytes T naïfs en Th17 (Bertola et al., 2012). De plus, le pourcentage de DC CD103<sup>+</sup>, considérées comme anti-inflammatoires (Jaensson et al., 2008), diminue dans le TA obèse. Une autre étude a montré que les DC du TA obèse expriment moins de CD40, CD80, CD86, CMH-I et CMH-II que les DC de la rate, mais qu'elles sécrètent plus d'IL-6, de TGF-β et d'IL-23 et peuvent induire une différenciation de type Th17 *in vitro* (Chen et al., 2014). En outre, une étude a démontré que les DC sont nécessaires pour l'accumulation macrophagique dans le TA et le foie, et que l'absence de DC améliore la sensibilité à l'insuline (Stefanovic-Racic et al., 2012). Cependant, cette étude est basée sur le phénotype de souris invalidées pour le ligand de Flt3, or ces souris présentent un défaut de l'hématopoïèse qui peut altérer d'autres cellules immunitaires. De plus, dans cette étude la mutation induit une résistance à la prise de poids des souris sous HFD, donc il est difficile de savoir si les observations sont dues à un défaut de DC ou à une différence de poids entre les souris (Stefanovic-Racic et al., 2012). Finalement, une étude a mis en évidence que la délétion du CD11c est bénéfique pour induire une diminution de l'inflammation dans le TA et de la résistance à l'insuline chez des souris obèses (Patsouris et al., 2008), mais comme indiqué précédemment cela peut également toucher les macrophages du TA.

Chez l'humain, très peu d'études ont été faites. Il a tout de même été montré que dans le TA sous-cutané d'individus obèses le nombre de cellules DC (CD11c<sup>+</sup>CD1c<sup>+</sup>) corrèle positivement avec l'IMC et la résistance à l'insuline (Bertola et al., 2012).

Finalement, il semble très important de réaliser de nouvelles études des DC dans le TA au cours de l'obésité car elles jouent un rôle essentiel dans l'immunité innée et l'immunité adaptative.

### **III.A.3. Les granulocytes**

Les granulocytes, appelés autrefois polynucléaires, sont des leucocytes qualifiés de « non spécifiques » dans la mesure où ils ne sont pas dirigés contre un seul antigène. Il existe trois types de granulocytes : les neutrophiles, les basophiles et les éosinophiles. Cette dénomination est basée sur leur affinité à absorber des colorants neutres, basiques, ou acides à base d'éosine. Si actuellement aucune étude ne semble impliquer les basophiles dans l'inflammation du TA, par contre les neutrophiles et les éosinophiles ont été détectés dans le TA et sont impliqués dans la régulation de son inflammation.

#### *IV.A.3.a. Les éosinophiles*

Les éosinophiles sont les premiers effecteurs de la défense immunitaire contre les infections parasitaires (Guigas and Molofsky, 2015). Pour cela, elles s'attaquent aux parasites de l'organisme sans les phagocyter, mais se fixent dessus et déversent leurs granules enzymatiques. Elles jouent également un rôle très important dans les réactions allergiques (Rosenberg et al., 2013; Stone et al., 2010). Les éosinophiles circulent dans un état immature et infiltrent les tissus spécifiques de l'inflammation, où leur activation se fait par l'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF. Elles sont des médiateurs importants de l'immunité de type Th2 anti-inflammatoire. Pour cela, elles produisent une grande variété de cytokines telles que l'IL4, l'IL10 et l'IL13 qui participent à la polarisation des macrophages anti-inflammatoires M2 et à la différenciation des lymphocytes anti-inflammatoires Th2 (Spencer and Weller, 2010; Stone et al., 2010). Les éosinophiles sécrètent également de nombreuses autres cytokines, chimiokines et FGs (Davoine and Lacy, 2014).

Chez la souris, il a été montré que le nombre d'éosinophiles est diminué dans le TA obèse (Wu et al., 2011). En outre, en dépit du faible nombre d'éosinophiles dans le TA murin (environ 20 000/g), en utilisant un gène rapporteur GFP (Green Fluorescent Protein) sur le promoteur de l'IL-4, il a été démontré que 90 % de l'IL-4 produit par le TA mince provient des éosinophiles (Wu et al., 2011). Ainsi, dans le TA mince, les éosinophiles peuvent induire une polarisation des macrophages M2 par une forte sécrétion d'IL-4 et d'IL-13, mais au cours de l'obésité ce phénomène est altéré. De plus, l'induction d'une augmentation d'éosinophiles dans le TA obèse, par une infection parasitaire, induit une amélioration de la tolérance au glucose (Wu et al., 2011). En outre, il a été démontré que l'IL-4 induit une amélioration de la sensibilité à l'insuline. En effet, la suppression de STAT6 qui régule l'IL-4 induit une résistance à l'insuline, alors que l'injection d'IL-4 au niveau systémique induit une diminution de l'inflammation et de la résistance à l'insuline dans le TA de souris obèses (Ricardo-Gonzalez et al., 2010). Il a également été montré qu'une délétion du CCR2 pouvait induire une accumulation accrue d'éosinophiles spécifiquement dans la cavité péritonéale et dans le TA de souris obèse, dont certaines étaient présentes au niveau des CLSs. De plus, leur nombre corrèle positivement avec les macrophages M2, l'expression de Foxp3 et de cytokines anti-inflammatoires de type Th2 telles que IL-4, IL-5 et IL-13 (Bolus et al., 2015). Finalement, il a récemment été montré que les éosinophiles peuvent jouer un rôle dans le développement du TA beige (Qiu et al., 2014; Rao et al., 2014), qui est un TA capable de dissiper l'énergie au lieu de la stocker grâce à l'expression de la protéine découplante UCP1 dans des adipocytes particuliers.

Cependant, chez l'humain, aucune étude n'a encore mis en évidence la présence d'éosinophiles dans le TA. Au niveau circulant, une étude a montré une corrélation positive entre le nombre d'éosinophiles et certains marqueurs du DT2 (Fukui et al., 2009), tandis qu'une autre étude observe l'inverse (Zhu et al., 2013).

Finalement, les éosinophiles s'avèrent être une cible thérapeutique intéressante de par leur capacité à diminuer la réponse inflammatoire permettant ainsi une amélioration de l'inflammation du TA et de la sensibilité à l'insuline. Cependant tout reste à découvrir chez l'humain.

### *III.A.3.b. Les neutrophiles*

Les neutrophiles sont des cellules phagocytaires qui constituent 60 à 70 % des leucocytes sanguins chez l'humain. Ils sont rapidement recrutés dans les tissus infectés mais meurent rapidement après avoir phagocyté quelques agents pathogènes car ils ne sont pas en mesure de renouveler leurs lysosomes (Pillay et al., 2010). Ainsi, ils sont considérés comme le premier type de cellules effectrices dans les réponses inflammatoires aiguës (Pham, 2006). Or, à la différence des éosinophiles, ils sont plutôt impliqués dans les réponses immunitaires de type Th1 antibactériennes en sécrétant de nombreuses cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et CCL2 (Amulic et al., 2012; Mantovani et al., 2011).

Le nombre de neutrophiles augmente dans le TA de souris obèses très précocement, seulement 3 jours après le début du régime, avant même celui des macrophages (Elgazar-Carmon et al., 2008; Talukdar et al., 2012). La première étude a montré que l'infiltration des neutrophiles était transitoire, de l'ordre de quelques jours (Elgazar-Carmon et al., 2008), mais une étude plus récente n'a pas confirmé ce résultat et a plutôt observé une accumulation sur le long terme, comme l'accumulation macrophagique (Talukdar et al., 2012). Cette étude a également mis en évidence que les neutrophiles induisent une inflammation et une résistance à l'insuline principalement par leur sécrétion d'élastase. En effet, les souris HFD traitées avec un inhibiteur de l'élastase ou délétées pour l'élastase ont une amélioration de l'inflammation et de la sensibilité à l'insuline (Talukdar et al., 2012). Cela passerait encore par une activation du TLR4 et une induction de la polarisation des M1.

Chez l'humain, les études sont principalement basées sur des marqueurs systémiques. En effet, il a été montré que la concentration plasmatique de facteurs dérivés des neutrophiles, comme la myéloperoxydase et la calprotectine, ainsi que le nombre de neutrophiles activés, marqués par le CD66b, sont augmentés chez les individus obèses (Nijhuis et al., 2009). Cependant, il n'a pas été trouvé d'augmentation du nombre de cellules positives pour la myéloperoxydase dans le TA d'individus obèses. De plus, il a aussi été démontré que l'augmentation de la sécrétion de CXCL2 dans le TA obèse pouvait stimuler l'adhésion des neutrophiles sur les cellules endothéliales du TA et contribuer à leur état inflammatoire au cours de l'obésité (Rouault et al., 2013).

Finalement, bien que les neutrophiles semblent être impliqués dans l'inflammation et la résistance à l'insuline dans le TA au cours de l'obésité, il faut encore confirmer ces résultats chez l'humain.

#### **III.A.4. Les mastocytes**

Les mastocytes sont des cellules abondantes dans les barrières telles que la peau et les muqueuses, et sont un des premiers effecteurs contre les agents pathogènes en raison de leur capacité de dégranulation rapide (Bischoff, 2007). Les mastocytes sont ainsi impliqués dans les réactions de défense contre les infections bactériennes et parasitaires, mais leur activation incontrôlée contribue de manière significative au développement de l'asthme, d'allergies et de l'anaphylaxie (Galli et al., 2005). Pour cela, les mastocytes activés sécrètent un large spectre de médiateurs inflammatoires tels que l'histamine, l'héparine, le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 mais également des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-4 et l'IL-10 (Abraham and St John, 2010; Voehringer, 2013).

Dans le TA des souris obèses, le nombre de mastocytes est augmenté (Altintas et al., 2011; Liu et al., 2009). Or, des souris sous HFD dépourvues de mastocytes ont une diminution de la prise de poids, une amélioration de l'inflammation et de la sensibilité à l'insuline dans le TA, ainsi qu'une diminution des risques cardiovasculaires (Liu et al., 2009; Xu and Shi, 2012). Parmi les divers médiateurs produits par les mastocytes, l'IL-6 et l'IFN- $\gamma$  semblent jouer un rôle majeur dans l'induction de l'inflammation et des comorbidités associées à l'insuline (Liu, et al., 2009).

Chez l'humain, une étude a montré une corrélation entre le nombre de mastocytes et plusieurs caractéristiques du TA obèse telles que la fibrose, l'accumulation macrophagique et l'inflammation. De plus, le nombre de mastocytes est augmenté dans le TA d'individus obèses DT2 comparé au TA d'individus minces et obèses (Divoux et al., 2012).

Finalement, bien que nécessitant des études supplémentaires, surtout chez l'humain, il semblerait que les mastocytes induisent une résistance à l'insuline de façon indirecte en influençant l'adiposité plutôt qu'en régulant directement l'inflammation.

#### **III.A.5. Les cellules lymphoïdes innées**

Les cellules lymphoïdes innées (ILC) sont des cellules de la lignée lymphoïde mais n'ayant pas de spécialité antigénique. Inconnues jusqu'à peu, elles sont classées selon leurs facteurs de transcriptions, leur profil cytokinique et certains marqueurs de surface (Artis and Spits, 2015; Walker et al., 2013). Il en existe 4 groupes. Le premier groupe comprend les cellules effectrices innées avec une activité cytotoxique, les cellules NK. Le deuxième groupe comprend les ILC1 qui sécrètent de l'IFN- $\gamma$ . Le troisième groupe est composé d'ILC2 qui sont définies par leur sécrétion cytokinique de type Th2 telles que l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 ainsi que le facteur de transcription GATA3. Le quatrième groupe inclue les ILC3 et les cellules inductrices de tissu lymphoïde (LTi). Les ILC3 expriment le récepteur d'activité des cellules NK, le NKp46 et le facteur de transcription ROR $\gamma$ t. Mais au contraire des ILC1 elles ne produisent pas de médiateurs cytotoxiques. Elles sont principalement présentes dans les muqueuses et l'intestin. Les ILC3 et les LTi sécrètent de l'IL-17A et de l'IL-22 (Lanier, 2013; Spits et

al., 2013). Finalement, les différents sous-types d'ILC représentent les différentes sous-populations de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> effecteurs.

Pour l'instant seules les cellules NK et les ILC2 ont été récemment décrites dans la régulation de l'inflammation du TA.

#### *IV.A.5.a. Les cellules ILC2*

Il a été montré que les ILC2 sont essentielles à l'homéostasie du TA mais que leur nombre diminue dans le TA obèse (Brestoff et al., 2015; Molofsky et al., 2013; Moro et al., 2010). En effet, elles produisent les cytokines IL-5 et IL-13 qui permettent le recrutement des éosinophiles et la polarisation des monocytes en macrophages M2 (Molofsky et al., 2013; Wu et al., 2011). Il a également été montré que le traitement de souris obèses par l'IL-25 induit l'augmentation du nombre d'ILC2 dans le TA ayant pour conséquences une perte de poids et une amélioration de la tolérance au glucose (Hams et al., 2013). De plus, dans certaines conditions, l'IL-33, qui diminue dans le TA obèse, peut également induire les ILC2, puis le recrutement d'éosinophiles (Hashiguchi et al., 2015; Molofsky et al., 2015). En outre, elles ont été récemment décrites comme jouant un rôle important dans l'induction du TA beige (Brestoff et al., 2015; Lee et al., 2015).

Chez l'humain, il a également été mis en évidence une diminution du pourcentage d'ILC2 dans le TA d'individus obèses (Brestoff et al., 2015).

Finalement, les ILC2 seraient importantes pour l'homéostasie du TA en induisant un microenvironnement anti-inflammatoire et une activation de la dépense énergétique, ce qui limiterait l'obésité. Cependant très peu de données fonctionnelles existent chez l'humain.

#### *III.A.5.b. Les cellules NK*

Les cellules « tueuses naturelles » (NK) sont des cellules sentinelles de l'organisme à la recherche de cellules infectées, transformées ou stressées. Elles expriment de nombreux récepteurs activateurs et inhibiteurs afin de détecter des différents signes de cytopathologie, tout en assurant la tolérance du « soi » (Vivier et al., 2011). La diminution du CMH-I ou la surexpression de ligands du stress sur les cellules cibles stimulent la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et/ou l'activité cytotoxique des cellules NK (Shi et al., 2011). Elles jouent notamment un rôle important dans la défense immunitaire contre l'infection de la grippe (Gazit et al., 2006), mais également dans des maladies auto-immunes telles que le diabète de type 1 (Gur et al., 2010). De plus, dans les tissus infectés, l'IFN- $\gamma$  dérivé des cellules NK est indispensable à la polarisation des macrophages M1 (Goldszmid et al., 2012), et la polarisation des macrophages *in vitro* par l'IFN- $\gamma$  induit un phénotype similaire à celui des macrophages M1 du TA (Han et al., 2013).

Chez la souris, il est clairement établi que les cellules NK jouent un rôle pathologique au cours de l'obésité. En effet, leur nombre et leur activation augmentent très rapidement après un régime HFD et



leur production accrue d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  induit une polarisation des macrophages de type M1, entraînant une inflammation et une résistance à l'insuline (Lee et al., 2016; Wensveen et al., 2015). De plus, leur déplétion est bénéfique car cela induit une diminution de l'infiltration monocytaire, de l'inflammation du TA et de la résistance à l'insuline chez des souris obèses (Lee et al., 2016; O'Rourke et al., 2014; Wensveen et al., 2015). Finalement, l'inhibition de l'IFN- $\gamma$  réduit le développement d'une résistance à l'insuline associée à l'obésité (Rocha et al., 2008; Wong et al., 2011).

Chez l'humain en revanche, bien que le nombre de NK et leur cytotoxicité augmentent dans le sang des individus obèses (Basu et al., 2009; Ferlazzo et al., 2004), leur nombre ne change pas dans le TA (Duffaut et al., 2009b). Il a toutefois été montré qu'elles pouvaient avoir un phénotype plus inflammatoire avec l'augmentation de l'expression du récepteur activateur NKG2D (O'Rourke et al., 2013), mais ce résultat n'a pas été confirmé dans une autre étude (Wensveen et al., 2015). En outre, au niveau systémique, une récente étude a mis en évidence que l'obésité est associée à l'augmentation de l'activation des cellules NK mesurée par les niveaux de CD69 et de granzyme B. Cependant, les cellules NK des individus obèses ont une incapacité à répondre à une infection et à éliminer des cellules tumorales, sûrement en raison de leur activation chronique (Viel et al., 2016). Cela pourrait contribuer à la déficience des individus obèses à monter une réponse immunitaire adéquate face aux pathogènes ou aux tumeurs.

Finalement, chez la souris, les cellules NK augmentent dans le TA au cours de l'obésité et induisent une polarisation des macrophages M1 *via* une sécrétion accrue de l'IFN- $\gamma$ , ce qui entraîne une inflammation chronique et une résistance à l'insuline. Cependant, ces résultats restent à confirmer chez l'humain.

### **III.B. Les lymphocytes T entre immunité innée et immunité adaptative**

Trois sous-ensembles de lymphocytes T représentent un pont entre l'immunité innée et adaptative : les lymphocytes NKT, les lymphocytes  $T\gamma\delta$  et les cellules T invariantes associées aux muqueuses (MAIT). En effet, ces trois types cellulaires expriment le récepteur des cellules T (TCR), mais leur répertoire TCR est limité ou même unique, ce qui restreint leur reconnaissance antigénique. Or, des données récentes font état de leur implication dans l'homéostasie et l'inflammation du TA au cours de l'obésité.

#### **III.B.1. Les lymphocytes NKT**

Il a été proposé une classification des lymphocytes NKT en trois groupes, les NKT de type 1 ou invariants, les NKT de type 2 ou non classiques, et les NKT-like qui sont moins bien décrits (Godfrey et al., 2004). La sous-population de NKT invariants (iNKT) est la mieux décrite dans le TA. Ces lymphocytes iNKT expriment une chaîne alpha du TCR semi-invariante, ainsi ils ne reconnaissent pas des complexes CMH/peptides, mais des lipides et glycolipides présentés par la molécule CD1d (Beckman et al., 1994; Brigl and Brenner, 2004). De plus, ils peuvent induire des réponses immunitaires pro- et anti-inflammatoires par leur aptitude à sécréter de grandes quantités d'IFN- $\gamma$  et d'IL-4 en fonction du microenvironnement tissulaire (Berzins et al., 2011; Godfrey and Rossjohn, 2011).

Le rôle exact des cellules iNKT dans l'inflammation et la résistance à l'insuline du TA induite par l'obésité n'est pas encore très clair. En effet, l'étude de la déplétion des cellules iNKT dans des souris HFD a donné des résultats contradictoires, cela induit soit une amélioration (Ohmura et al., 2010; Satoh et al., 2012; Wu et al., 2012), soit pas d'effets (Kotas et al., 2011; Mantell et al., 2011), soit une aggravation (Ji et al., 2012a, 2012b; Lynch et al., 2012; Schipper et al., 2012) de l'inflammation et de la résistance à l'insuline comparés aux souris contrôles.

Chez l'humain, il y a moins de lymphocytes iNKT et d'expression du CD1d dans le TA obèse. De plus le nombre de lymphocytes iNKT corrèle négativement avec la résistance à l'insuline et la glycémie à jeun (Ji et al., 2012a; Lynch et al., 2009).

Finalement, certaines études tendent à montrer un effet protecteur des lymphocytes iNKT concernant l'obésité et ses conséquences métaboliques, mais il faut encore développer des analyses fonctionnelles car la plupart de ces résultats sont obtenus à partir de modèles murins déficients en lymphocytes iNKT, à savoir les souris CD1d<sup>-/-</sup> et J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup>, et certains résultats sont contradictoires.

#### **III.B.2. Les lymphocytes $T\gamma\delta$**

Les LT $\gamma\delta$ , qui représentent moins de 2 % des lymphocytes, possèdent le TCR mais n'expriment généralement pas les co-récepteurs CD4 et CD8 associés. Leur TCR est composé de deux chaînes protéiques  $\gamma$  et  $\delta$  par opposition au TCR des LT dits conventionnels qui est constitué des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ .

Le répertoire TCR est également plus restreint que le TCR $\alpha\beta$ . Comme les LT CD4<sup>+</sup>, ils peuvent avoir des programmes transcriptionnels distincts, de type «  $\gamma\delta$ -T1 » ils expriment le facteur Tbet et sécrètent de l'IFN- $\gamma$ , de type «  $\gamma\delta$ -T1 » ils expriment le ROR $\gamma$ t et sécrètent de l'IL-17 (Korn and Petermann, 2012). Ainsi, il existe un grand nombre de sous-types de LT $\gamma\delta$  qui sont en majorité localisés dans les épithéliums des muqueuses digestive et respiratoire jouant un rôle crucial dans la mise en place de la réponse immunitaire mais également dans les maladies auto-immunitaires (Chien et al., 2014; Vantourout and Hayday, 2013).

Dans le TA murin, une étude a mis en évidence une augmentation des LT $\gamma\delta$  (Caspar-Bauguil et al., 2005). Plus récemment, une autre étude a confirmé cette augmentation des LT $\gamma\delta$  et a montré qu'ils sont la principale source de l'IL-17 dans le TA chez la souris. Ainsi, ils peuvent induire une inflammation, diminuer l'adipogenèse et altérer le métabolisme adipocytaire dans le TA obèse (Zúñiga et al., 2010). Une autre étude montre également un rôle inflammatoire et insulino-résistant des LT $\gamma\delta$  dans le TA obèse en induisant une augmentation de CCL2, IL-6 et TNF- $\alpha$  (Mehta et al., 2015).

Finalement, les LT $\gamma\delta$  semblent être impliqués dans l'inflammation du TA, mais de nombreuses analyses restent à faire, notamment chez l'humain qui ont très peu de LT $\gamma\delta$  dans leur TA et où aucune étude fonctionnelle n'a été faite.

### **III.B.3. Les cellules MAIT**

Les cellules T invariantes associées aux muqueuses (MAIT) sont un sous-type de lymphocytes récemment décrit. Elles se trouvent dans le sang périphérique, la muqueuse intestinale et abondamment dans le foie (Dusseaux et al., 2011; Le Bourhis et al., 2011). Comme les lymphocytes iNKT, elles expriment une chaîne  $\alpha$  semi-invariante du TCR et sont restreintes au CMH-I MR1 (Treiner et al., 2003). Elles peuvent produire de l'IFN- $\gamma$ , du granzyme B et de l'IL-17 (Dusseaux et al., 2011), et sont impliquées dans l'immunité antibactérienne (Leeansyah et al., 2014; Ussher et al., 2014).

Chez l'humain, une récente étude a montré que malgré une diminution de leur pourcentage, les MAIT circulantes des individus obèses sécrètent plus de molécules pro-inflammatoires. De plus, bien que le pourcentage de MAIT soit inchangé dans le TA obèse, elles sécrètent plus d'IL-17 comparé aux MAIT du TA d'individus minces (Magalhaes et al., 2015a, 2015b).

Finalement, les MAIT semblent être impliquées dans l'inflammation du TA obèse humain, mais cette population représente un très faible pourcentage des cellules du TA (2 % des CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) et suit la « tendance » des autres types de LT conventionnels. De plus, pour une fois, aucune étude n'a encore été faite dans des modèles murins.

### **III.C. Les cellules de l'immunité adaptative**

Les leucocytes du système immunitaire adaptatif sont nommés les lymphocytes. En termes de structure et de fonction, on distingue deux grandes lignées lymphocytaires différentes, les lymphocytes B (LB) et les lymphocytes T (LT). De plus, on distingue également deux types de LT, les LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques et les LT CD4<sup>+</sup> auxiliaires.

#### **III.C.1. Les lymphocytes B**

Les LB sont responsables de l'immunité humorale et produisent des protéines de la famille des immunoglobulines (Igs) appelées anticorps. D'abord leur maturation a lieu dans la moelle osseuse, puis une fois stimulés par un antigène ils se transforment en plasmocytes. Ainsi, un plasmocyte peut produire jusqu'à 5 000 anticorps par seconde afin de neutraliser spécifiquement l'antigène activateur. Ils peuvent également servir de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et sécréter différentes cytokines (Cooper, 2015). De ce fait, ils jouent un rôle primordial dans l'élimination des agents pathogènes et des certaines maladies auto-immunitaires (LeBien and Tedder, 2008). Cependant, il existe différents sous-types de LB, comme les LB régulateurs (Breg) qui régulent la tolérance immunitaire et atténue les réponses inflammatoires excessives (Mauri and Bosma, 2012).

Les LB sont augmentés dans le TA obèse et jouent un rôle délétère pro-inflammatoire et insulino-résistant. Cela est dû à leur profil de sécrétion et l'activation des LT (DeFuria et al., 2013), mais également en raison de leur production pathologique d'immunoglobulines, principalement d'IgG2b (Winer et al., 2011). De plus, certaines études ont montré que leur accumulation dans le TA de souris sous HFD arrive avant celle des LT mais après celle des macrophages (Duffaut et al., 2009b; Winer et al., 2011). Il a également été montré que les LB et les Igs peuvent être accumulés au niveau des CLSs (Winer et al., 2011). De plus, cette même étude démontre que les souris sous HFD déficientes en LB (B<sup>null</sup>) ont une amélioration de l'inflammation, de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline au niveau du TA. Or, en injectant des LB ou des Igs de souris « sauvages » obèses dans les souris B<sup>null</sup> il y avait une « restauration » du phénotype pathologique, mais pas si cela était fait dans des souris obèses déficientes en lymphocytes totaux (RAG1<sup>-/-</sup>). Ainsi, le rôle pathologique passe essentiellement par l'activation des LT. Finalement, un traitement par immunothérapie anti-CD20, qui est l'un des marqueurs principaux des LB, améliore l'inflammation et les paramètres métaboliques des souris sous HFD. Bien qu'il ressorte clairement de cette étude que les Igs peuvent favoriser la résistance à l'insuline dans des souris HFD, peut-être en induisant une mort adipocytaire ou en inhibant la signalisation à l'insuline, leur rôle dans les événements précurseurs sont plus contestables car il a été montré que les souris B<sup>null</sup> présentent également des altérations dans la population de LT (Baumgarth et al., 2000; Ngo et al., 2001).

Chez l'humain, en revanche il existe très peu de données sur la variation et le rôle des LB au sein du TA au cours de l'obésité. Une étude a montré la présence de LB dans les CLSs (McDonnell et al.,

2012), pourtant leur nombre est extrêmement faible (Duffaut et al., 2009a). Il a également été observé que la résistance à l'insuline chez les individus obèses est liée à des auto-anticorps dirigés contre un profil spécifique d'auto-antigènes au niveau sanguin (Winer et al., 2011).

Finalement, les LB semblent être impliqués dans l'inflammation et la résistance à l'insuline du TA au cours de l'obésité. Cependant, d'autres études doivent être effectuées chez l'humain pour élucider le rôle des LB dans la physiopathologie du TA et notamment l'existence d'anticorps auto-immuns.

### **III.C.2. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>**

Les LT de type CD8<sup>+</sup>, exprimant le co-récepteur CD8 sur leur TCR, sont dits cytotoxiques. En effet, après maturation dans le thymus (Koch and Radtke, 2011), et activation par un antigène pathogène, les LT CD8<sup>+</sup> peuvent tuer des cellules infectées. Pour cela ils utilisent des fonctions cytotoxiques et non cytotoxiques. La molécule perforine va perforer la membrane plasmique puis la granzyme B va induire une cytotoxicité cellulaire. De plus, les LT CD8<sup>+</sup> expriment le ligand Fas (CD95L) qui va induire une apoptose en présence de Fas sur la cellule infectée. Finalement ils sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  qui vont amplifier la réponse immunitaire, des LT CD4<sup>+</sup> par exemple (Bevan, 2004). Ainsi, les LT CD8<sup>+</sup> jouent ainsi un rôle crucial dans la défense immunitaire contre les infections intracellulaires virales, bactériennes et parasitaires (Zhang and Bevan, 2011). Ils ont également un rôle important dans la mémoire immunologique (Harty and Badovinac, 2008). Généralement les LT CD8<sup>+</sup> expriment le facteur de transcription Tbet qui induit la sécrétion de l'IFN- $\gamma$ , cependant des sous-populations ont été récemment décrits comme des LT CD8<sup>+</sup> sécrétant de l'IL-17 (Tc17) ou des LT CD8<sup>+</sup> régulateurs (Cox et al., 2011).

Chez la souris, il a été clairement mis en évidence une augmentation du pourcentage de LT CD8<sup>+</sup> dans le TA au cours de l'obésité (Rausch et al., 2008) pouvant induire une inflammation et une résistance à l'insuline (Nishimura et al., 2009). Cette accumulation de LT CD8<sup>+</sup> à lieu avant celle des macrophages et des LT CD8<sup>+</sup> sont présents au niveau des CLSs, ce qui peut potentiellement induire la polarisation des macrophages M1. De plus, dans les souris HFD, la déplétion des LT CD8<sup>+</sup>, par un anti-CD8, ou dans des souris transgéniques CD8a<sup>-/-</sup>, induit l'amélioration de l'inflammation et des paramètres métaboliques, qui sont restaurés après un transfert adoptif de LT CD8<sup>+</sup>. Mais étonnamment, le déficit des LT CD8<sup>+</sup> ne prévient pas complètement le phénotype de résistance à l'insuline, de plus le transfert adoptif de LT CD8<sup>+</sup> dans des souris Rag<sup>-/-</sup> (sans lymphocytes) sous HFD n'aggrave pas la résistance à l'insuline préexistant, ce qui suggère que d'autres facteurs ou d'autres cellules immunitaires sont nécessaires pour induire pleinement le rôle pathologique des LT CD8<sup>+</sup> (Nishimura et al., 2009; Winer et al., 2009a). Une autre étude a également montré l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires par les LT CD8<sup>+</sup> infiltrant le TA obèse, et de plus ils ont un répertoire TCR restreint comparé à ceux de la rate suggérant qu'ils sont spécifiques pour un ou des antigènes encore inconnus (Yang et al., 2010).

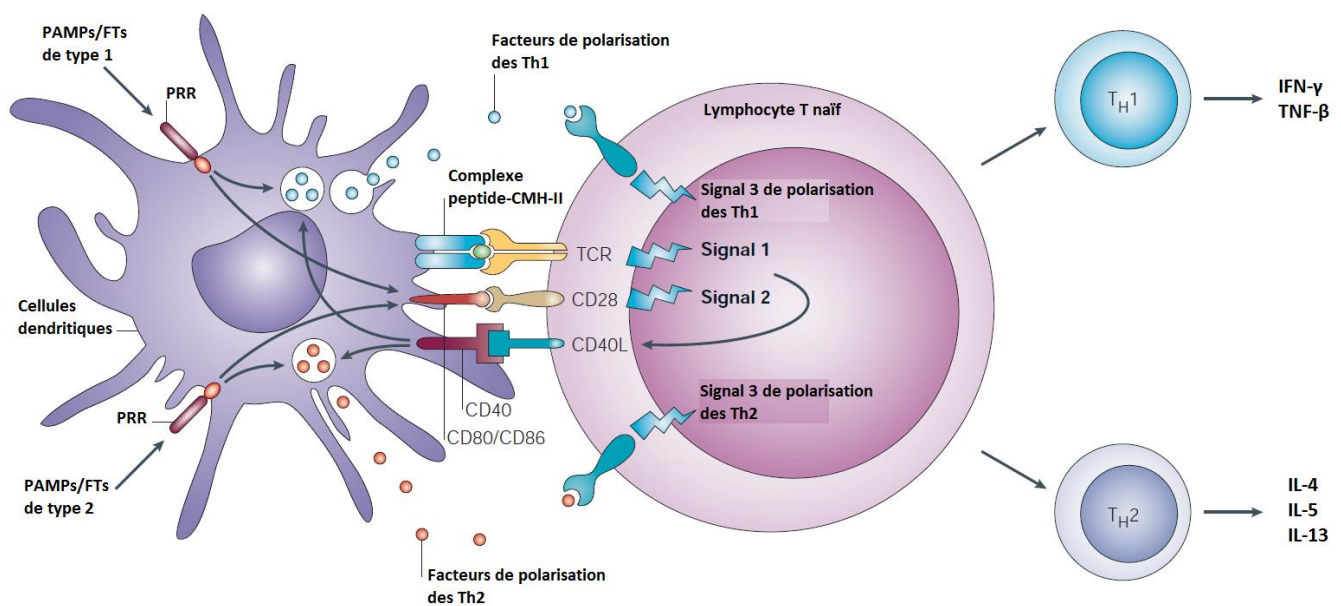
Finalement, ces données indiquent que les LT CD8<sup>+</sup> sont nécessaires à l'initiation, la propagation et la maintenance de l'inflammation du TA obèse. Cependant, leur fonction principalement de cytotoxicité n'est pas encore élucidée dans le TA obèse. De plus, il n'y a aucune donnée permettant d'impliquer une pathogénicité des LT CD8<sup>+</sup> dans l'obésité humaine.

### **III.C.3. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>**

#### *III.C.3.a. Activation et polarisation des sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>*

Les LT CD4<sup>+</sup>, qui expriment le co-récepteur CD4 sur leur TCR, sont des intermédiaires de la réponse immunitaire, ils sont dits auxiliaires (« h » pour helpers). En effet, ils peuvent proliférer après un contact avec un antigène présenté par une CPA afin d'activer d'autres types de cellulaires qui agiront de manière plus directe sur les pathogènes. Ainsi, Les LT CD4<sup>+</sup> régulent d'autres fonctions lymphocytaires, comme la prolifération clonale et la différenciation des LT CD8<sup>+</sup> en cellules cytotoxiques et des LB en plasmocytes (Zhu and Paul, 2008). Après leur maturation dans le thymus, les LT dits naïfs doivent subir une série d'événements afin d'acquérir leurs fonctions effectrices. Cela passe par trois signaux lors de leur interaction avec une CPA. Tout d'abord l'engagement du TCR sur le complexe CMH-II/peptide antigénique présent à la surface de la CPA (signal 1), ensuite la costimulation de différentes molécules présentes à la membrane des deux cellules (signal 2), enfin la présence de certaines cytokines spécifiques (signal 3) (**Figure 18**). Ces trois signaux vont conduire à l'activation, la prolifération et la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> (Kapsenberg, 2003).

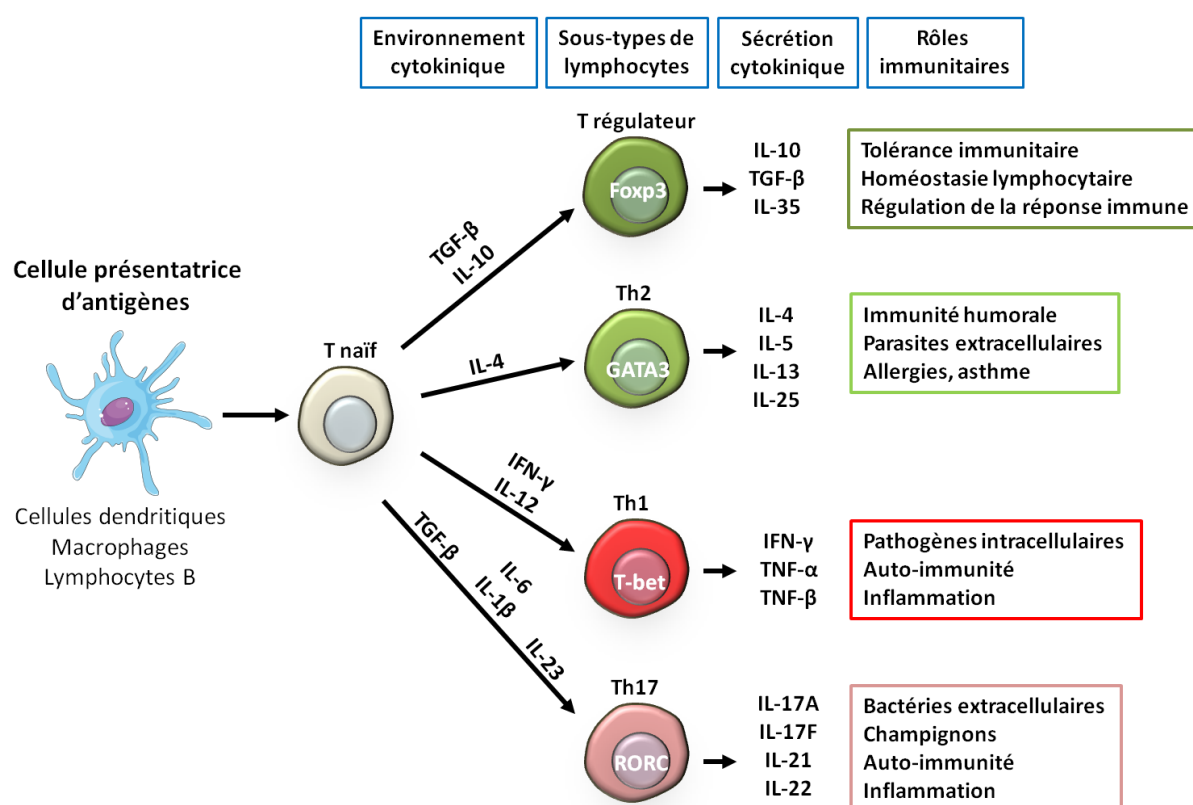
De plus, les cytokines sécrétées par les deux cellules en interaction, plus les cytokines présentes dans le microenvironnement, vont influencer la polarisation des LT CD4<sup>+</sup>. En effet, il existe différentes sous-populations de LT CD4<sup>+</sup>, caractérisées par leurs facteurs de transcriptions, leurs marqueurs de surface, et leur sécrétion cytokinique. Toutes ces caractéristiques distinctes vont déterminer les principales fonctions immunes de ces cellules (**Figure 19**).



**Figure 18 : Les trois signaux nécessaires à l'activation et la différenciation de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> auxiliaires, ici exemple Th1 et Th2**

(D'après : (Kapsenberg, 2003))

(Un LT naïf doit subir une série d'événements afin d'acquérir ses fonctions effectrices. Tout d'abord, le signal 1 est le signal spécifique de l'antigène *via* l'engagement du TCR sur le complexe CMH-II/peptide antigénique présent à la surface d'une CPA (ici une DC). Ensuite, le signal 2 est le signal de costimulation de différentes molécules présentes sur le LT naïf, principalement du CD28 dont le déclenchement est médié par son interaction avec les molécules CD80/CD86 exprimées par la DC ayant préalablement internalisée des PAMPs (motifs moléculaires associés aux pathogènes) *via* ses PPRs (récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires). Enfin, le signal 3 est le signal de polarisation qui est médié par différents facteurs solubles ou membranaires, tels que l'IL-12 ou l'IL-4 qui favorisent le développement des Th1 ou des Th2 respectivement. Pour une expression optimale de chaque profil de LTh, il est souvent nécessaire d'avoir une stimulation par rétroaction du CD40L (ligand du récepteur CD40) qui est exprimée sur les LT après l'activation des signaux 1 et 2. TNF-β, facteur de nécrose tumorale-β).



**Figure 19 : Différenciations et fonctions immunes des principales sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> auxiliaires**

(D'après : (Di Cesare et al., 2009))

(Les cytokines présentes dans le microenvironnement, vont influencer la polarisation des LT CD4<sup>+</sup>. En effet, il existe différentes sous-populations de LT CD4<sup>+</sup>, caractérisées par leurs facteurs de transcriptions, leurs marqueurs de surface, et leur sécrétion cytokinique. Toutes ces caractéristiques distinctes vont déterminer les principales fonctions immunes de ces cellules).

#### *Lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires centraux*

Durant l'interaction LT CD4<sup>+</sup> naïf/CPA, l'intégration de plusieurs signaux détermine donc la qualité de la réponse immunitaire mise en œuvre. Ainsi ces paramètres définissent non seulement le sous-type de lymphocytes, mais aussi l'ampleur de l'expansion clonale et la proportion de cellules effectrices ou mémoires générées (Lanzavecchia and Sallusto, 2000). Seulement une faible fraction de cellules ayant proliféré lors de la réponse immunitaire se maintient en tant que cellules mémoires. L'analyse de différents marqueurs de surface a été particulièrement utile pour déterminer les hétérogénéités fonctionnelles qu'il existe au sein des LT CD4<sup>+</sup> mémoires humaines. En effet, l'expression combinée de molécules d'adhésion et de récepteurs aux chimiokines confère aux cellules leur propriétés de migration et de localisation dans les différents tissus du corps humain (Sallusto et al., 1999, 2000).



Ainsi l'utilisation combinée des marqueurs suivants CD3, CD4, CD62L (ou CCR7), CD45RA est suffisante pour discriminer les LT CD4<sup>+</sup> naïfs (CD62L<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>), effecteurs (CD62L<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>), centraux mémoires (CM : CD62L<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>) et effecteurs mémoires (EM : CD62L<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>) dans un échantillon de sang périphérique humain.

### *III.C.3.b. Les lymphocytes Th2*

Les LT CD4<sup>+</sup> naïfs sont polarisés en Th2 en présence d'IL-2 et d'IL-4, ils expriment les facteurs de transcriptions GATA3 et STAT6, et sécrètent principalement des cytokines connues pour être anti-inflammatoires telles que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-13 et l'IL-25. Ils favorisent ainsi un microenvironnement cytokinique pour leur propre polarisation et celle des macrophages M2. Finalement les Th2 limite l'inflammation aiguë et chronique, ce qui est cohérent avec l'accumulation de ces cellules à des stades tardifs de la réponse immunitaire (Zhu and Paul, 2008).

Dans le TA des souris HFD, il a été montré que la proportion des Th2 diminue ainsi que l'expression de l'IL-4 (Deiuliis et al., 2011; Strissel et al., 2010; Winer et al., 2009a). Dans leur étude, Winer et ses collègues ont utilisé des souris Rag1<sup>-/-</sup>, c'est-à-dire sans lymphocytes. Or, ces souris sous HFD ont une prise de poids, une hypertrophie adipocytaire, une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline plus élevées que les souris sauvages, suggérant un rôle protecteur des lymphocytes dans l'obésité. De plus, le transfert de LT CD4<sup>+</sup> dans ces souris induit une augmentation de l'IL-4 et de l'IL-13 ainsi qu'une amélioration de la sensibilité à l'insuline. Par contre, le transfert de LT CD4<sup>+</sup> STAT6<sup>-/-</sup> ne reproduit pas ces effets bénéfiques sur le métabolisme, suggérant qu'ils passent par les Th2. Une autre étude a également montré que des souris obèses traitées par de l'IL-4 ont une diminution de l'inflammation du TA viscéral et une amélioration de la tolérance au glucose (Ricardo-Gonzalez et al., 2010). Finalement, de façon intéressante, grâce à des souris IL-4-GFP, il a été montré que la source majeure d'IL-4 dans le TA viscéral ne provient pas de Th2 mais provient des éosinophiles (Wu et al., 2011).

Chez l'humain, les résultats sont seulement basés sur de l'expression génique et sont contradictoires. En effet, le facteur de transcription GATA est diminué dans le TA viscéral des individus obèses dans une étude (Deiuliis et al., 2011) et au contraire augmenté dans une autre (Zeyda et al., 2011a).

Ainsi, jusqu'à présent, les résultats sur le rôle des Th2 dans le TA au cours de l'obésité sont peu nombreux et contradictoires chez l'humain. Cependant, les Th2 et leur sécrétion d'IL-4 peuvent induire une homéostasie tissulaire et un microenvironnement anti-inflammatoire, ce qui pourrait contribuer à augmenter la sensibilité à l'insuline.

### *III.C.3.c. Les lymphocytes T régulateurs*

Les LT régulateurs (Tregs) sont une sous-population des LT CD4<sup>+</sup> impliqués dans l'homéostasie lymphoïde, la tolérance du « soi », et le contrôle des maladies auto-immunes. Les Tregs peuvent être

de deux origines : d'une part, les Tregs « naturels » (nTregs) générés au cours de la maturation thymique des LT effecteurs et d'autre part, les Tregs « inductibles » (iTregs) générés lors de la polarisation de LT CD4<sup>+</sup> naïfs (Josefowicz et al., 2012). En effet, les LT CD4<sup>+</sup> naïfs peuvent être polarisés en iTregs en présence d'IL-2 et de TGF- $\beta$ , ils expriment le facteur de transcriptions Foxp3 et sécrètent principalement des cytokines connues pour être anti-inflammatoires et immunorégulatrices telles que l'IL-10 et le TGF- $\beta$  (Vignali et al., 2008). Ainsi, une déficience en Tregs a été impliquée dans de nombreuses maladies auto-immunes (Dejaco et al., 2006), et au contraire un nombre élevé de Tregs est délétère pour l'immunité anti-tumorale (Mougiakakos et al., 2010).

Chez la souris mince, il a été montré que le TA viscéral contient un grand nombre de Tregs Foxp3<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>, représentant 40 à 50 % du compartiment des LT CD4<sup>+</sup> (Feuerer et al., 2009). Or, cette fraction de Tregs est plus importante que celles retrouvées dans le TA sous-cutané, le foie, les poumons, mais également que celles de la rate et des ganglions lymphatiques. De plus, la proportion de Tregs du TA viscéral augmente avec l'âge suggérant un rôle très spécifique de cette population dans l'homéostasie du TA chez la souris mince. Cependant, au cours de l'obésité le pourcentage de Tregs diminue drastiquement, d'environ 75 %, dans le TA viscéral mais ni dans le TA sous-cutané ni dans la rate. Une autre étude a également souligné que cette diminution du pourcentage de Tregs est négativement corrélée à l'augmentation du pourcentage de macrophages M1 CD11c<sup>+</sup> (Deiuliis et al., 2011). De façon intéressante, une autre étude a montré que bien que le pourcentage de Tregs diminue dans le TA viscéral obèse, leur nombre reste constant, suggérant plutôt un surplus de LT effecteurs submergeant ainsi les fonctions immunosuppressives des Tregs (Winer et al., 2009). Feuerer et coll. ont démontré que la déplétion des Tregs induit une inflammation dans le TA et une insulínémie, et au contraire qu'un transfert adoptif de Tregs induit une expression accrue d'IL-10 et une tendance à la diminution de la glycémie (Feuerer et al., 2009). Une autre étude a aussi mis en évidence que l'induction des Tregs, par une administration orale d'un anticorps anti-CD3 plus du  $\beta$ -glucosylcéramide, induit une diminution des macrophages et du TNF- $\alpha$  dans le TA et une amélioration de la résistance à l'insuline dans souris HFD (Ilan et al., 2010).

Finalement, il a été montré que les Tregs du TA ont une signature génique différente de celle des Tregs d'autres tissus. En particulier ils expriment de nombreux gènes impliqués dans le contrôle du métabolisme lipidique et ils expriment également le facteur de transcription adipogénique PPAR $\gamma$  (Cipolletta et al., 2012). Ainsi, une partie des effets bénéfiques des molécules antidiabétiques de la famille des thiazolidinediones (TZD) qui activent PPAR- $\gamma$  pourrait passer par une modulation des Tregs du TA. En effet, les TZD augmentent les Tregs dans le TA mais pas dans les autres tissus et l'absence de Tregs dans le TA réduit les effets bénéfiques des TZD sur la sensibilité à l'insuline (Cipolletta, 2014). Une autre caractéristique des Tregs du TA est que leur répertoire TCR est restreint par rapport au Treg des organes lymphoïdes suggérant qu'un ou des antigènes sont responsables de leur présence dans le TA. Leur identification permettrait de mieux comprendre les mécanismes

d'accumulation et de rétention des Tregs dans le TA et pourrait éventuellement permettre de prévenir la baisse des Tregs dans ce tissu lors de l'obésité.

Chez l'humain, cependant, il y a peu d'études et des résultats contradictoires. Une étude a montré que le ratio Th1/Tregs du TA viscéral représenté par le ratio de l'expression T-bet/Foxp3 augmente avec l'obésité et est corrélé avec l'IMC (sur seulement 6 individus) (Winer et al., 2009). Cependant, une autre étude a montré que l'expression de Foxp3 augmente dans les TA sous-cutané et viscéral des individus obèses, et que le ratio Th1/Tregs a même plutôt tendance à diminuer (Zeyda et al., 2011a). De plus, il a été montré que, contrairement aux résultats murins, c'est le TA sous-cutané qui possède la plus grande proportion de Tregs (Feuerer et al., 2009).

Finalement, ces études indiquent que les Tregs sont bénéfiques pour l'homéostasie du TA mince et peuvent inhiber l'inflammation induite par l'obésité grâce à leur sécrétion d'IL-10 et à l'induction de macrophages M2. Mais au cours de l'obésité, le nombre de Tregs ne diminue pas, voire même, augmente afin de réguler l'inflammation incontrôlée. Cependant la chronicité de cette pathologie et l'accumulation simultanée de nombreuses cellules immunitaires induisent une altération de la balance anti-inflammatoire/pro-inflammatoire et ainsi submergent l'immunorégulation des Tregs.

### *III.C.3.d. Les lymphocytes Th1*

Les LT CD4<sup>+</sup> naïfs peuvent être polarisés en Th1 en présence d'IL-12 et d'IFN- $\gamma$ , ils expriment les facteurs de transcriptions T-bet et STAT4, et sécrètent principalement des cytokines connues pour être pro-inflammatoires telles que l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$  et la lymphotoxine- $\alpha$  (ou TNF- $\beta$ ). Ainsi, les Th1 peuvent induire la polarisation des monocytes en macrophages M1, activer les macrophages et augmenter la prolifération des LT CD8<sup>+</sup>. Ils jouent donc un rôle crucial dans la défense immunitaire contre les bactéries intracellulaires et les virus, mais également dans les maladies inflammatoires chroniques (Zhu and Paul, 2008).

Il est maintenant bien établi qu'au cours de l'obésité il y a une augmentation du nombre de Th1 et de la production d'IFN- $\gamma$  dans le TA des souris obèses (Kintscher et al., 2008; Rocha et al., 2008; Strissel et al., 2010; Winer et al., 2009a). De plus, cette accumulation arrive rapidement, après environ 6 semaines de HFD (Strissel et al., 2010). Or, l'IFN- $\gamma$  semble être un acteur clé de l'inflammation et de la résistance à l'insuline, en effet les souris HFD IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> ou IL-12p35<sup>-/-</sup> (qui est nécessaire à la polarisation de Th1) ont une nette amélioration de l'inflammation, de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline (O'Rourke et al., 2009; Rocha et al., 2008; Winer et al., 2009a). Or, des mécanismes complémentaires ont été décrits dans l'initiation de l'inflammation et de la résistance à l'insuline par l'IFN- $\gamma$ . Tout d'abord, l'IFN- $\gamma$  peut directement induire une sécrétion accrue de chimiokines par les adipocytes 3T3-L1 (Rocha et al., 2008). Ensuite, l'IFN- $\gamma$  pourrait inhiber

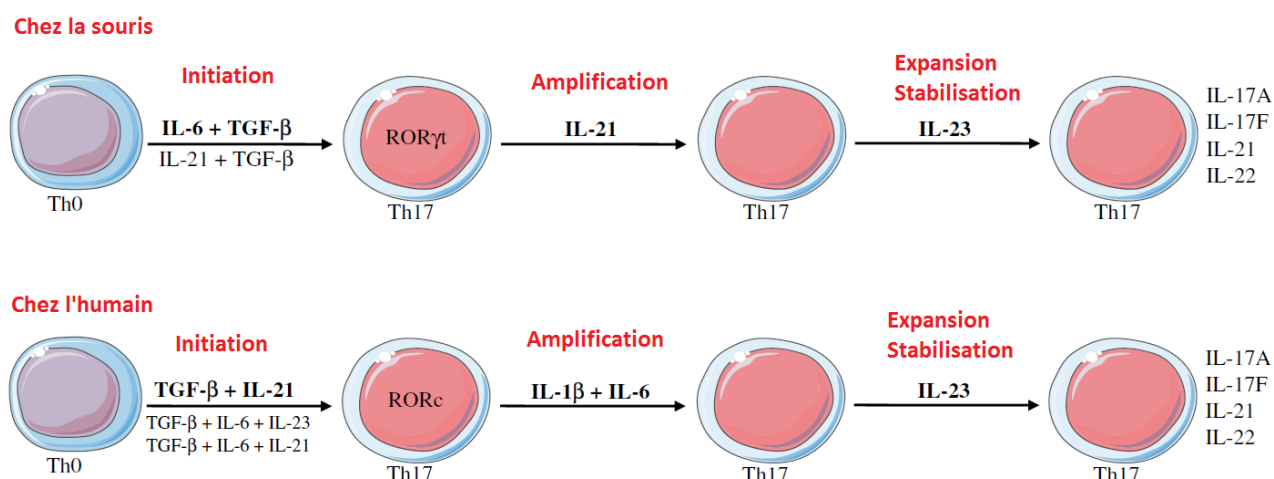
l'adipogénèse ainsi que la captation du glucose et l'augmentation des enzymes lipogéniques induite par l'insuline dans les adipocytes (Duffaut et al., 2009a; McGillicuddy et al., 2009). Or, les souris HFD IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> ont bien une diminution du nombre de macrophages M1 et des CLSs dans le TA viscéral (O'Rourke et al., 2009; Rocha et al., 2008). De plus, il a été récemment montré que les macrophages, de par leur fonction de CPA, peuvent induire les Th1 et ce de façon exacerbée au cours de l'obésité (Cho et al., 2014; Morris et al., 2013). Finalement, cette fonction de présentation antigénique pourrait également être réalisée par les adipocytes eux-mêmes, ce qui induirait une augmentation du profil Th1 (Deng et al., 2013).

Chez l'humain, plusieurs études ont clairement mis en évidence une accumulation des Th1 et une augmentation de l'IFN- $\gamma$  dans le TA obèse, principalement dans le TA viscéral, bien que peu d'études fonctionnelles aient été réalisées (Duffaut et al., 2009a; McLaughlin et al., 2014; O'Rourke et al., 2009; Zeyda et al., 2011b).

Finalement, ces résultats indiquent un rôle crucial des Th1 dans la régulation de la réponse inflammatoire et de la résistance à l'insuline dans le TA au cours de l'obésité. Pour cela l'IFN- $\gamma$  peut agir directement sur les adipocytes, mais surtout induire une polarisation des macrophages M1 qui à leur tour sécrètent de l'IL-12 nécessaire à la polarisation des Th1, créant ainsi une boucle pro-inflammatoire qui maintient le microenvironnement dans un état d'inflammation chronique et d'insulinorésistance.

### *III.C.3.e. Les lymphocytes Th17*

Plus récemment, une troisième sous-population de LT CD4<sup>+</sup> effecteurs a été identifiée, les Th17 (Aggarwal et al., 2003). Contrairement aux Th1 et aux Th2 leur polarisation est plus complexe, flexible et différente entre la souris et l'humain (**Figure 20**). En effet, chez la souris il a été montré que l'IL-6, le TGF- $\beta$  et l'IL-21 pouvaient induire une polarisation Th17 (Laurence and O'Shea, 2007; Mangan et al., 2006). Chez l'humain, la polarisation des LT CD4<sup>+</sup> naïfs en Th17 a plutôt lieu en présence d'IL-6 et d'IL-1 $\beta$ , mais peut aussi avoir lieu en présence d'IL-21 et de TGF- $\beta$  (Acosta-Rodriguez et al., 2007; Yang et al., 2008). Le facteur de transcription est le ROR $\gamma$ t chez la souris et son orthologue chez l'humain, le RORC, et dans les deux cas l'IL-23 est nécessaire au maintien du phénotype Th17 (Korn et al., 2009; Wilson et al., 2007). Les Th17 sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-17A, l'IL-17F, l'IL-21 et l'IL-22 qui, selon la cellule cible, induisent l'expression de cytokines inflammatoires (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) et de chimiokines (CXCL8, CXCL1, CXCL10) permettant ainsi le recrutement de cellules de l'immunité innée et notamment des neutrophiles (Korn et al., 2009). De plus, l'ensemble des données actuelles chez la souris et chez l'humain montre un rôle majeur des Th17 dans les pathologies auto-immunes et inflammatoires (Noack and Miossec, 2014). En outre, les Th17 expriment le récepteur CCR6 qui est spécifique de la chimiokine CCL20 (Baba et al., 1997; Hirota et al., 2007; Singh et al., 2008).



**Figure 20 : Polarisation des Th17 chez la souris et chez l'humain**

(D'après : (Noack and Miossec, 2014))

(Chez la souris, le TGF- $\beta$  et l'IL-6 initient la différenciation des Th17 et activent le facteur de transcription ROR $\gamma$ t. Puis, la sécrétion d'IL-21 amplifie la différenciation de manière autocrine. Enfin, l'IL-23 sert à l'expansion et au maintien de la sous-population Th17. Chez l'homme, la différenciation est majoritairement déclenchée par le TGF- $\beta$  et l'IL-21 qui induisent le facteur de transcription RORc. Puis, l'IL-1 $\beta$  et IL-6 permettent l'amplification de la différenciation des Th17. Enfin, l'IL-23 sert à l'expansion et au maintien de la sous-population Th17).

Chez la souris, il a été montré que l'expression de CCL20, le pourcentage de LT CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> ainsi que leur sécrétion d'IL-17 augmentent dans le TA obèse (Bertola et al., 2012; Chen et al., 2014; Winer et al., 2009b; Zúñiga et al., 2010). De plus, Winer et coll. ont mis en évidence que l'augmentation des Th17 au cours de l'obésité accentue l'encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE) (Winer et al., 2009b). Dans une autre étude, il a été démontré que la source principale de l'IL-17 du TA ne provient pas des Th17 mais des LT $\gamma\delta$  (Zúñiga et al., 2010). Dans cette même étude, il a également été mis en évidence que les souris HFD IL-17<sup>-/-</sup> ont plus de TA, sûrement dû au fait que l'IL-17 peut inhiber l'adipogenèse, et une amélioration de la tolérance au glucose comparé aux souris HFD sauvages. Cependant, ces effets bénéfiques sont perdus chez des souris âgées. De façon intéressante, Zúñiga et coll. ont également observé que les souris HFD TCR $\gamma\delta$ <sup>-/-</sup> n'ont pas de différences métaboliques avec les souris HFD sauvages, suggérant la compensation de l'IL-17 par une autre source cellulaire (Zúñiga et al., 2010).

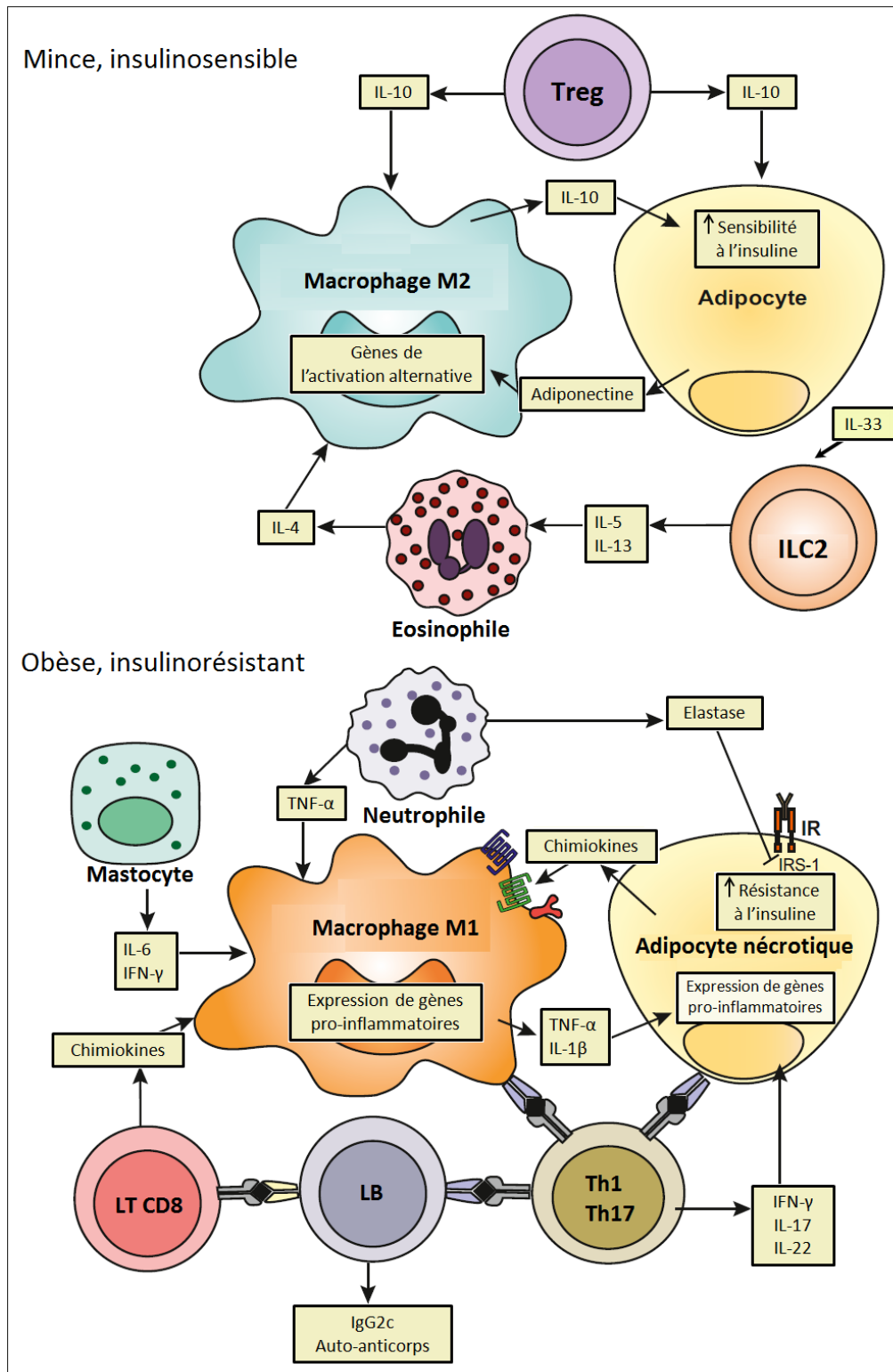
Chez l'humain, il a été mis en évidence que l'expression de l'IL-17 est augmentée dans les LT du TA sous-cutané obèse (Bertola et al., 2012). De plus, une autre étude a montré que le pourcentage des LT CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> et des LT CD4<sup>+</sup>IL-22<sup>+</sup> augmente dans le TA sous-cutané des individus obèses insulino-résistants comparé aux individus minces et aux individus obèses insulino-sensibles (Fabbrini et al., 2013). En outre, il a été souligné que l'expression de CCL20 augmente dans les adipocytes du TA

sous-cutané obèse, suggérant un potentiel recrutement accru des Th17 qui expriment le récepteur CCR6 spécifique à cette chimiokine (Duffaut et al., 2009a). Une étude a montré que les cellules souches du TA obèse pouvaient induire un phénotype Th17, résultant à un environnement pro-inflammatoire qui inhibe l'adipogenèse et la sensibilité à l'insuline (Eljaafari et al., 2015). Plus récemment, une étude a mis en évidence une augmentation du pourcentage des Th17 et de l'expression de marqueurs spécifiques des Th17 tels que RORC, l'IL-17 et l'IL-23R dans le TA viscéral d'individus obèses « non sains métaboliquement » comparé aux individus obèses « sains métaboliquement » et aux individus minces. De plus, les auteurs de cette étude ont observé l'expression du CD39 sur les LT CD4<sup>+</sup> effecteur qui représente un nouveau marqueur des Th17 du TA inflammé et qui leur confère une résistance face à la mort cellulaire induite par l'ATP (Pandolfi et al., 2016).

Finalement, ces résultats suggèrent un rôle pathologique des Th17 dans l'obésité, avec un effet délétère plus prononcé chez les individus obèses DT2. Cependant, d'autres études sont nécessaires pour définir la contribution de l'IL-17 dans l'inflammation du TA. De plus, il a été montré que les LT $\gamma\delta$  représentent une population négligeable dans le TA humain, suggérant de réelles disparités entre les modèles murins et la physiopathologie humaine.

Ainsi, le TA est composé et infiltré par différentes populations de cellules immunitaires impliquées aussi bien dans l'immunité innée que l'immunité adaptative. Les proportions de ces populations cellulaires sont modifiées lors de l'obésité aboutissant schématiquement à une augmentation des populations pro-inflammatoires alors que les populations anti-inflammatoires prédominent dans le TA mince (**Figure 21 et Tableau 4**). Les cellules immunitaires interagissent avec les cellules métaboliques telles que les pré-adipocytes, les cellules endothéliales et les adipocytes matures, et influent leur métabolisme. Les adipocytes influent également la fonction de ces cellules immunitaires indiquant qu'immunité et métabolisme sont intrinsèquement reliés et ouvrant un nouveau champ d'investigation dans le domaine des maladies métaboliques : **l'immuno-métabolisme**. Les différents facteurs pro-inflammatoires sécrétés dans le TA au cours de l'obésité participent et aggravent les dysfonctions du TA contribuant ainsi à l'insulinorésistance. Au niveau moléculaire, ces différents facteurs agissent en activant différentes voies de signalisation inflammatoire.

Finalement, l'accumulation de toutes les cellules immunitaires, principalement les macrophages et les lymphocytes pro-inflammatoires, au sein du TA obèse va induire un état inflammatoire chronique local et systémique de bas grade et ainsi entraîner les complications métaboliques liées à l'obésité.



**Figure 21 : Régulation de l'inflammation et la sensibilité à l'insuline par les cellules immunitaires innées et adaptatives du tissu adipeux et dérégulation au cours de l'obésité**

(D'après : (McNelis and Olefsky, 2014))

(Dans le TA mince insulinosensible (en haut), l'IL-33 sécrétée par les cellules non-immunitaires/adipocytaires induit la production d'IL-5 et d'IL-13 par les ILC2, ce qui favorise le recrutement et la maturation des éosinophiles. Or, la sécrétion d'IL-4 par les éosinophiles et celle d'adiponectine par les adipocytes maintiennent l'activation alternative des macrophages. Ainsi, les M2 et les Treg préservent la sensibilité à l'insuline des adipocytes *via* leurs sécrétions d'IL-10. Dans le TA obèse insulino-résistant (en bas), les adipocytes subissent différents stress cellulaires, ce qui conduit à une sécrétion accrue de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires qui stimulent le recrutement de nombreuses cellules immunitaires ainsi que la polarisation des monocytes en M1 *via* la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK et les LT CD8<sup>+</sup>. Or, la production de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  par les M1 ainsi que la sécrétion d'élastase par les neutrophiles induisent une résistance à l'insuline dans les adipocytes. De plus, les macrophages et les adipocytes sont potentiellement capables de présenter des antigènes, *via* le CMH-II, aux LB et LT, ce qui induit une réponse immunitaire adaptative avec notamment une production d'auto-anticorps par les LB et une expansion clonale des Th1 et des Th17. Ainsi, la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires par toutes ces cellules crée une boucle inflammatoire et contribue à la résistance à l'insuline).



Cellules immunitaires	Profil de sécrétion	Proportion dans le TA obèse	Impact sur la résistance à l'insuline
Macrophages M1	Pro-inflammatoire : TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, NOS2	Souris : ↗ Humain : ↗	Souris : ↗ Humain : ?
Macrophages M2	Anti-inflammatoire : IL-10, IL-1Ra, Arginase 1	Souris : ↘ Humain : ↗ ?	Souris : ↘ Humain : ?
Cellules dendritiques	Pro-inflammatoire : IL-12, IL-15, IL-18	Souris : ↗ Humain : ↗	Souris : ↗ Humain : ?
Eosinophiles	Anti-inflammatoire : IL-4, IL-10, IL-13	Souris : ↘ Humain : ?	Souris : ↘ Humain : ?
Neutrophiles	Pro-inflammatoire : NE, MPO, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8	Souris : ↗ Humain : ?	Souris : ↗ Humain : ?
Mastocytes	Pro-inflammatoire : Histamine, PGE2, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ,	Souris : ↗ Humain : ↗	Souris : ↗ Humain : ?
ILC2	Anti-inflammatoire : IL-5, IL-13	Souris : ↘ Humain : ↘	Souris : ↘ Humain : ?
Cellules NK	Pro-inflammatoire : Perforines, granzymes, IFN- $\gamma$	Souris : ↗ Humain : = ?	Souris : ↗ Humain : ?
Lymphocytes NKT	Pro- et anti-inflammatoire : TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-13	Souris : ↘ Humain : ↘	Souris : ↗ Humain : ?
Lymphocytes $\gamma\delta$	Pro-inflammatoire : IL-17	Souris : ↗ Humain : ?	Souris : ? Humain : ?
MAIT	Pro-inflammatoire : Granzyme B, IL-17	Souris : ? Humain : = mais ++IL-17	Souris : ? Humain : ?
Lymphocytes B	Pro-inflammatoire : IgG2c	Souris : ↗ Humain : ?	Souris : ↗ Humain : ?
Lymphocytes T CD8 <sup>+</sup>	Pro-inflammatoire : Perforines, granzymes, IFN- $\gamma$	Souris : ↗ Humain : ↗	Souris : ↗ Humain : ?
Lymphocytes Th2	Anti-inflammatoire : IL-4, IL-5, IL-13	Souris : ↘ Humain : ?	Souris : ↘ Humain : ?
Lymphocytes Treg	Anti-inflammatoire : IL-10, TGF- $\beta$	Souris : ↘ Humain : ?	Souris : ↘ Humain : ?
Lymphocytes Th1	Pro-inflammatoire : IFN- $\gamma$	Souris : ↗ Humain : ↗	Souris : ↗ Humain : ?
Lymphocytes Th17	Pro-inflammatoire : IL-17, IL-22	Souris : ↗ Humain : ↗	Souris : ↗ Humain : ?

**Tableau 4 : Résumé de l'implication des différentes populations immunitaires dans l'inflammation et la résistance à l'insuline du tissu adipeux au cours de l'obésité**

# Résultats



# Résultats

## Projet de recherche

Les systèmes métabolique et immunitaire font partie des structures fondamentales des êtres vivants. De plus, la réponse immunitaire et la régulation métabolique sont hautement liées et dépendantes l'une de l'autre. Cette interface, qui est un mécanisme central pour l'homéostasie de l'organisme, est altérée au cours d'un excès alimentaire chronique aboutissant *in fine* à un ensemble de complications métaboliques chroniques, telles que l'obésité, le DT2 et les maladies cardiovasculaires.

En effet, en l'absence d'infection ou de processus auto-immun, un état inflammatoire chronique de bas grade se développe chez les individus obèses et joue un rôle majeur dans le développement des comorbidités.

Or, le TA est grandement responsable de cet état *via* la production accrue de biomolécules pro-inflammatoires au cours de l'obésité. De plus, une série d'études récentes chez l'homme et dans les modèles murins a mis en évidence une réponse immune, qui met en jeu des cellules de l'immunité innée et de l'immunité adaptative, dans le TA. Alors que les travaux initiaux ont souligné l'importance des macrophages dans l'inflammation tissulaire, des études récentes démontrent des altérations de la composition des populations des LT.

Chez la souris obèse, le profil anti-inflammatoire des LT CD4<sup>+</sup> régulatrices et de type Th2 dérive vers un profil pro-inflammatoire avec une accumulation de LT CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> de type Th1. Cependant, chez l'humain, les données expérimentales concernant les LT du TA restent parcellaires, ainsi les mécanismes de recrutement, d'interactions cellulaires et leurs rôles au cours de l'obésité sont peu connus.

Les objectifs de cette thèse sont d'analyser les caractéristiques phénotypique et fonctionnelle des LT au cours de l'obésité et d'étudier leur rôle sur trois mécanismes essentiels de la physiopathologie du TA obèse que sont l'inflammation, la fibrose et le métabolisme adipocytaire.

Nous soutenons l'hypothèse qu'au cours de l'obésité, il y a un déséquilibre du phénotype lymphocytaire avec une accumulation de LT pro-inflammatoires ayant pour conséquence une perpétuation et une aggravation des altérations cellulaires favorisant le dysfonctionnement du TA obèse.

Tout d'abord, dans une première partie, nous avons caractérisé les populations de LT pro-inflammatoires du TA d'individus minces, obèses et obèses DT2, et décrit un « dialogue » cytokinique pro-inflammatoire entre les LT de type Th17 et les macrophages au cours de l'obésité.

Ensuite, dans une deuxième partie, nous avons analysé le rôle du microenvironnement du TA viscéral d'individus minces et d'individus obèses sur la polarisation des LT CD4<sup>+</sup> centraux mémoires issus du sang d'un individu sain.

Finalement, dans une troisième partie, nous avons étudié l'impact des cytokines du « dialogue » immunitaire pro-inflammatoire, l'IL-17 et l'IL-1 $\beta$ , sur les cellules non-immunitaires substantielles du TA, que sont les pré-adipocytes, les cellules endothéliales et les adipocytes matures.

## **I. Article 1 : Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des lymphocytes T et des macrophages du tissu adipeux : « dialogue » immunitaire pro-inflammatoire au cours de l'obésité**

Dalmas E, Venteclef N, **Caer C**, Poitou C, Cremer I, Aron-Wisnewsky J, Lacroix-Desmazes S, Bayry J, Kaveri SV, Clément K, André S, Guerre-Millo M. *T cell-derived IL-22 amplifies IL-1 $\beta$ -driven inflammation in human adipose tissue: relevance to obesity and type 2 diabetes*. **Diabetes**. 2014 Jun;63(6):1966-77

### Objectifs

Jusqu'à présent la plupart des résultats étudiant le phénotype et le rôle des LT au sein du TA obèse ont été obtenus dans des modèles murins ou à partir de TA sous-cutané humain. Or, comme je l'ai décrit dans l'introduction, d'une part, les réponses immunitaires ne sont pas totalement identiques dans le TA obèse entre les modèles murins et les humains et, d'autre part, l'inflammation du TA sous-cutané est plus faible et moins associée aux complications métaboliques que celle du TA viscéral. Enfin, peu d'études se sont intéressées aux interactions entre les cellules immunitaires du TA au cours de l'obésité.

Ainsi, avant mon arrivée au sein de l'équipe, une étude avait été initiée afin de caractériser le phénotype des LT du TA viscéral, d'étudier les différences entre des individus minces, obèses et obèses DT2, et finalement d'analyser leur interaction avec les macrophages du TA.

### Résultats

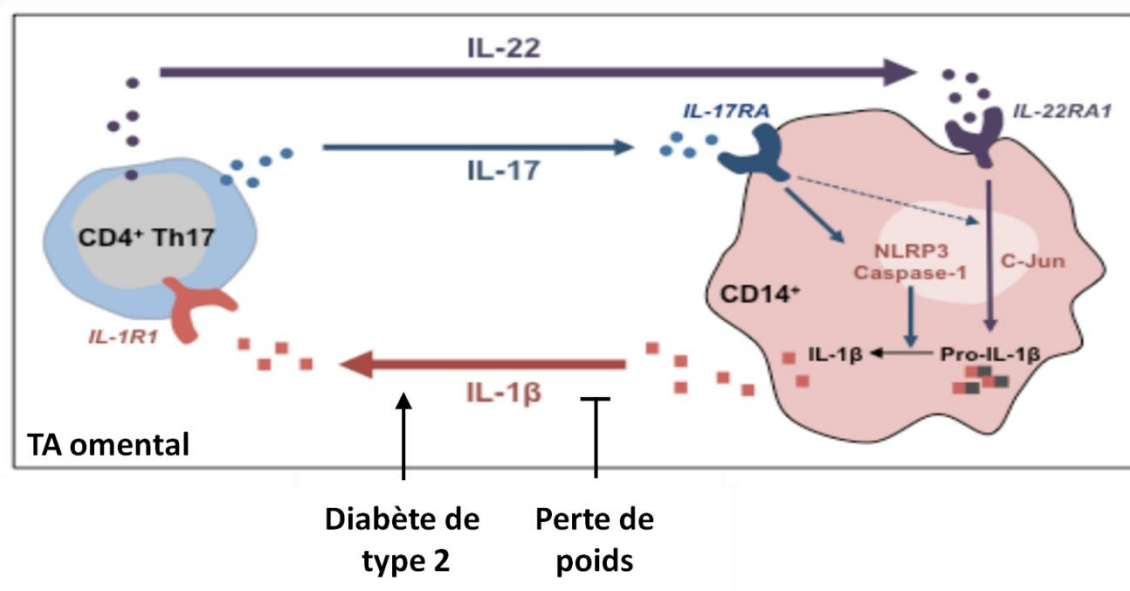
Tout d'abord, les co-auteurs de cette étude ont confirmé l'accumulation de macrophages pro-inflammatoires au sein du TA obèse et sa réversibilité après perte de poids induite par la chirurgie bariatrique. De façon intéressante, les macrophages des individus obèses DT2 ont un phénotype inflammatoire exacerbé, comme le montre la corrélation entre la sécrétion d'IL-1 $\beta$  macrophagique et le pourcentage d'hémoglobine glyquée (HbA1c) reflétant la glycémie sur 3 mois.

Ensuite, j'ai participé à la mise en évidence d'une augmentation du pourcentage des LT CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> IL-22<sup>+</sup>, ainsi que de leurs sécrétions, dans le TA viscéral obèse. Cette altération phénotypique lymphocytaire est également accrue avec le DT2 et corrèle avec le pourcentage d'HbA1c. De plus, nous avons montré que cette sécrétion d'IL-17 et d'IL-22 par les LT CD4<sup>+</sup> peut être induite par l'IL-1 $\beta$  dérivée des macrophages. Réciproquement, l'IL-22 peut induire une sécrétion accrue d'IL-1 $\beta$  par les macrophages du TA.

Pour finir, dans une partie plus moléculaire à laquelle je n'ai pas participé, il a été montré que l'IL-17 peut contribuer à l'activation de la voie NLRP3/Caspase-1, alors que l'IL-22 agit directement sur la voie C-Jun et l'expression de la pro-IL-1 $\beta$ .

### Conclusion

Finalement, nous avons identifié un « dialogue » paracrine pro-inflammatoire dans le TA viscéral obèse, mettant en jeu les cytokines IL-1 $\beta$  dérivée des macrophages et IL-17/IL-22 sécrétées par les Th17. Cette boucle pathologique, qui est diminuée après une perte de poids induite par la chirurgie bariatrique, contribuerait à aggraver l'inflammation dans le TA obèse, de manière exacerbée chez les individus DT2, et favoriserait ainsi les comorbidités associées à l'obésité (**Figure 22**).



**Figure 22 : Boucle pro-inflammatoire entre les lymphocytes Th17 et les macrophages du tissu adipeux obèse**



Elise Dalmas,<sup>1,2,3,4</sup> Nicolas Venteclef,<sup>1,2,3,4</sup> Charles Caer,<sup>1,2,3,4</sup> Christine Poitou,<sup>1,2,3,4,5</sup> Isabelle Cremer,<sup>1,2,3</sup> Judith Aron-Wisnewsky,<sup>1,2,3,4,5</sup> Sébastien Lacroix-Desmazes,<sup>1,2,3</sup> Jagadeesh Bayry,<sup>1,2,3</sup> Srinivas V. Kaveri,<sup>1,2,3</sup> Karine Clément,<sup>1,2,3,4,5</sup> Sébastien André,<sup>1,2,3,4</sup> and Michèle Guerre-Millo<sup>1,2,3,4</sup>



# T Cell–Derived IL-22 Amplifies IL-1 $\beta$ –Driven Inflammation in Human Adipose Tissue: Relevance to Obesity and Type 2 Diabetes

*Diabetes* 2014;63:1966–1977 | DOI: 10.2337/db13-1511

Proinflammatory cytokines are critically involved in the alteration of adipose tissue biology leading to deterioration of glucose homeostasis in obesity. Here we show a pronounced proinflammatory signature of adipose tissue macrophages in type 2 diabetic obese patients, mainly driven by increased NLRP3-dependent interleukin (IL)-1 $\beta$  production. IL-1 $\beta$  release increased with glycemic deterioration and decreased after gastric bypass surgery. A specific enrichment of IL-17- and IL-22-producing CD4<sup>+</sup> T cells was found in adipose tissue of type 2 diabetic obese patients. Coculture experiments identified the effect of macrophage-derived IL-1 $\beta$  to promote IL-22 and IL-17 production by human adipose tissue CD4<sup>+</sup> T cells. Reciprocally, adipose tissue macrophages express IL-17 and IL-22 receptors, making them sensitive to IL-17 and IL-22. IL-22 increased IL-1 $\beta$  release by inducing *pro-IL-1 $\beta$*  transcription through activation of C-Jun pathways in macrophages. In sum, these human data identified IL-1 $\beta$  and the T-cell cytokine IL-22 as key players of a paracrine inflammatory pathway previously unidentified in adipose tissue, with a pathological relevance to obesity-induced type 2 diabetes. These results provide an additional rationale for targeting IL-1 $\beta$  in obesity-linked type 2 diabetes and may have important implications for the conception of novel

combined anti-IL-1 $\beta$  and anti-IL-22 immunotherapy in human obesity.

A causal relationship between macrophage accumulation in adipose tissue and systemic insulin resistance has been clearly established in mouse studies, in which macrophage abundance can be manipulated through diet, genetic, or pharmacological intervention (1–3). In humans, however, the amount of adipose tissue macrophages is not consistently associated with variables reflecting alteration of glycemic status (4–6). Beside macrophages, growing emphasis is laid on T-cell populations, which vary in proportion and phenotype with obesity. Th2 and CD4<sup>+</sup> regulatory T cells with anti-inflammatory properties predominate in lean mice, while proinflammatory CD4<sup>+</sup> Th1 and CD8<sup>+</sup> T cells accumulate in adipose tissue of obese mice (reviewed elsewhere [7]). In human adipose tissue, the amount of proinflammatory T lymphocytes producing interferon (IFN)- $\gamma$  (8,9) or interleukin (IL)-17 (10) increased with the degree of adiposity. Moreover, IL-17- and IL-22-producing T cells accumulate in the adipose tissue of insulin-resistant obese subjects (11).

Recently, adipose tissue macrophages were found capable of processing antigens, thereby promoting the

<sup>1</sup>INSERM, UMR-S 1166 and 1138, Paris, France

<sup>2</sup>Sorbonne Universités, Pierre et Marie Curie-Paris6, Paris, France

<sup>3</sup>Université Paris Descartes, Paris, France

<sup>4</sup>Institute of Cardiometabolism and Nutrition, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

<sup>5</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Pitié-Salpêtrière Hospital, Nutrition and Endocrinology Department, Paris, France

Corresponding authors: Michèle Guerre-Millo, michele.guerre-millo@crc.jussieu.fr, and Elise Dalmas, elise.dalmas@unibas.ch.

Received 1 October 2013 and accepted 3 February 2014.

This article contains Supplementary Data online at <http://diabetes.diabetesjournals.org/lookup/suppl/doi:10.2337/db13-1511/-/DC1>.

S.A. and M.G.-M. contributed equally to this study.

© 2014 by the American Diabetes Association. See <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/> for details.



expansion of antigen-specific Th1 skewed CD4<sup>+</sup> T cells in diet-induced obese mice (12). Surprisingly, treatment of obese mice with major histocompatibility complex II-neutralizing antibodies did not improve whole-body glucose homeostasis or reduce inflammatory gene expression in the adipose tissue (12). Thus, once established, chronic adipose tissue inflammation may be fostered by local proinflammatory interplays independent of antigen presentation.

In the current study, we identified IL-1 $\beta$  as the main macrophage-derived cytokine increased in type 2 diabetic obese subjects, enhancing the release of IL-17 and IL-22 by adipose tissue CD4<sup>+</sup> T cells. Reciprocally, IL-22 upregulated *pro-IL-1 $\beta$*  transcription, leading to enhanced IL-1 $\beta$  production by adipose tissue macrophages. High levels of cytokine production in cells obtained from type 2 diabetic obese patients emphasize the pathological relevance of this paracrine inflammatory pathway hitherto unidentified in visceral adipose tissue.

## RESEARCH DESIGN AND METHODS

### Human Subjects and Adipose Tissue Sampling

We enrolled three groups of participants. Groups 1 and 2 were composed of morbidly obese subjects eligible for laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass (RYGP) surgery and included in a larger population previously described (13). Obese subjects of group 1 were segregated in non-diabetic (OB) and type 2 diabetic patients (OB/D) based on fasting glycemia over 7 mmol/L or use of antidiabetic drugs. All OB/D patients were treated with metformin, including seven patients with additional insulin. In group 2, the effect of weight loss was investigated at 3, 6, and 12 months after surgery. Four type 2 diabetic patients were treated with metformin, including one patient treated with insulin. Group 3 was composed of nonobese controls (NO) involved in programmed surgery for hernia, nissen fundoplication, or gallbladder ablation. NO participants were selected without dyslipidemia, type 2 diabetes, or chronic inflammatory or infectious diseases. In groups 1 and 3, subcutaneous and visceral adipose tissue biopsies were sampled during surgery. In group 2, subcutaneous adipose tissue biopsies were collected by periumbilical surgical incision of the skin under local anesthesia at the time of RYGP and 3, 6, and 12 months after surgery. The study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration and was registered in a public trial registry (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00476658?term=poitou&rank=1>). The Ethics Committee (CPP Ile-de-France) approved the clinical investigations for both obese and nonobese individuals. All subjects provided written informed consent when included in the surgery program. Characteristics of all subjects are shown in Table 1.

### Adipose Tissue Explants

Adipose tissue biopsies (0.1 g) were minced and incubated in 1 mL of endothelial cell basal medium (Promocell,

Heidelberg, Germany) containing 1% BSA, penicillin (100 units/mL), and streptomycin (100 mg/mL) for 24 h. Tissue viability was checked using lactate dehydrogenase assay according to manufacturer's instructions (Biovision, Milpitas, CA). Conditioned media were analyzed for cytokines using 27 Bio-Plex Pro Human Cytokine (BioRad, Munich, Germany). Immunoselected cell and coculture supernatant were analyzed by specific ELISA or by the Luminex technology (Milliplex Map Kit, Human Th17 Magnetic Bead Panel, Millipore, Billerica, MA).

### Adipose Cell Isolation

Adipocytes and cells of the stroma vascular fraction were obtained by collagenase digestion of adipose tissue (14). Stroma vascular fraction cells were resuspended in endotoxin-free PBS supplemented with 2% FCS and 1 mmol/L EDTA. Isolation of CD14<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, and CD4<sup>+</sup> cells was performed using positive selection magnetic beads (Stemcell Technologies, Vancouver, Canada). The CD14<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> cells (Neg) were also recovered. Fraction enrichment was verified by gene expression of leptin for adipocytes, CD3 for T cells and CD68 for macrophages. Cell viability was measured by flow cytometry in CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, and CD14<sup>+</sup> cells before culture experiments using the fixable Viability Dye eFluor 506 (eBioscience, San Diego, CA). Cell viability was over 80% whatever the donor's phenotype.

### DNA Microarray

An Illumina (San Diego, CA) RNA Amplification Kit (NuGEN, BiotinIL Module) was used according to the manufacturer's instructions to obtain biotin-labeled cDNA from 50 ng of total RNA extracted from adipose tissue CD14<sup>+</sup> cells. Hybridization was performed onto Illumina Human HT-12 v3.0 Expression BeadChips containing probes for 48,000 transcripts. Differential gene expression was determined with a standard analysis of microarray analysis using a false discovery rate of ~10%. We performed a functional analysis of these gene lists using the FunNet tool (15) (<http://www.funnet.info/>). Microarray experiments were performed according the Minimum Information About a Microarray Experiment guidelines. Data have been deposited in National Center for Biotechnical Information's Gene Expression Omnibus under accession number GSE54350.

### Cell Culture

CD14<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, and CD4<sup>+</sup> cell supernatants (10<sup>6</sup> cells/mL) were obtained after 48 h of culture in RPMI 1640 medium (Lonza, Berkshire, U.K.) supplemented with 10% FCS (HyClone, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA), plate-bound anti-CD3 (2.5  $\mu$ g/mL; UCHT1), and soluble anti-CD28 (1  $\mu$ g/mL; 37407) antibodies (R&D Systems, Minneapolis, MN). For coculture experiments, CD14<sup>+</sup> cells were cultured with autologous CD3<sup>+</sup> or CD4<sup>+</sup> for 48 h at 1/1 ratio in the same medium. When indicated, cells were cultured with 10, 50, or 100  $\mu$ mol/L glyburide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), with recombinant IL (rIL)-1 $\beta$  (10 ng/mL), IL-17 (20 ng/mL), IL-22 (20 ng/mL), or

**Table 1—Bioclinical variables of three groups of study participants**

	Group 1		Group 2				Group 3
	OB	OB/D	OB-M0	OB-M3	OB-M6	OB-M12	NO
Months postsurgery	0	0	0	3	6	12	0
Number of subjects	41	31	20	20	20	9	10
Sex (female/male)	33/8	17/14	15/5	15/5	15/5	9/0	5/5
Age (years)	41.6 ± 1.9	47.5 ± 1.9†	41.9 ± 2.9	—	—	—	60.1 ± 4.6
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	47.5 ± 1.2	48.1 ± 1.3	50.7 ± 2.2	42.0 ± 1.8*	38.4 ± 1.7*	34.8 ± 1.7*	26.1 ± 1.4
Type 2 diabetic subjects (n)	0	31	4	1	1	0	0
Glycemia (mmol/L)	5.4 ± 0.1	7.7 ± 0.7†	5.9 ± 0.2	5.1 ± 0.2*	4.7 ± 0.1*	4.8 ± 0.3*	4.9 ± 0.4
Insulinemia (μU/mL)	26.1 ± 4.0	22.4 ± 3.2	27.1 ± 3.3	10.9 ± 0.9*	10.4 ± 1.3*	10.8 ± 1.1*	—
HbA <sub>1c</sub> (%)	5.7 ± 0.1	7.5 ± 0.2†	6.1 ± 0.2	5.6 ± 0.1*	5.5 ± 0.1*	5.7 ± 0.2*	—
HbA <sub>1c</sub> (mmol/mol)	39.3 ± 0.7	56.7 ± 3.2	43.1 ± 2.1	37.4 ± 1.2	37.2 ± 0.9	38.4 ± 2.2	—
Leptin (ng/mL)	83.1 ± 5.7	65.8 ± 6.5†	49.6 ± 6.0	26.5 ± 3.3*	20.7 ± 2.3*	23.3 ± 2.9*	—
Adiponectin (μg/mL)	4.7 ± 0.4	3.4 ± 0.2†	5.1 ± 0.5	5.1 ± 0.5	5.1 ± 0.5	4.9 ± 0.5	—
CD68 <sup>+</sup> cells in SAT (n per 100 adipocytes)	11.1 ± 0.6	12.13 ± 1.3	12.1 ± 1.0	11.7 ± 1.5	8.7 ± 0.9*	11.4 ± 1.6	4.6 ± 1.7
CD68 <sup>+</sup> cells in VAT (n per 100 adipocytes)	13.5 ± 0.7	15.3 ± 1.1	13.2 ± 1.2	—	—	—	6.0 ± 2.2
Number of subjects with CLS in SAT	28	23	14	7	5	3	—

Data are shown as mean ± SEM. CLS, crown-like structure; M0, month 0; M3, month 3; M6, month 6; M12, month 12; SAT, subcutaneous adipose tissue; VAT, visceral adipose tissue. †*P* < 0.05 versus OB. \**P* < 0.05 versus OB-M0.

IFN-γ (20 ng/mL; all from Miltenyi Biotec); anti-IL-1β (2.5 μg/mL), anti-IL-17 (50 ng/mL), or anti-IL-22 (100 ng/mL; all from eBioscience); anti-IFN-γ (100 ng/mL; R&D Systems); or Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK) inhibitor (SP600125; Sigma-Aldrich). The respective isotype controls were used at the same concentration. Cell viability was estimated by the release of lactate dehydrogenase. Cell cytotoxicity nonstatistically ranged from 5 to 15% of the value obtained in cell lysate positive control, whatever the culture conditions and donor's phenotype.

#### Human Monocyte-Derived Macrophages and THP1 Cell Line

Human peripheral blood mononucleated cells were isolated from enriched buffy coats of healthy volunteer donors. Monocytes were purified by negative selection using Monocyte Isolation Kit II (Miltenyi Biotec). Monocytes were differentiated for 6 days in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS and 100 ng/mL of macrophage-colony stimulating factor (Miltenyi Biotec) to obtain nonpolarized monocyte-derived macrophages (MDM). THP1-defNLRP3 cells are human monocytes with reduced NLRP3 activity (InvivoGen, San Diego, CA). THP1-defNLRP3 and wild-type THP1 cells were cultured according to manufacturer's instructions.

#### Real-Time PCR

Total RNA was extracted using the RNeasy RNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). cDNAs were synthesized from and prepared with Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). SYBR green primers were used for

quantitative real-time PCR using the 7300 real-time PCR system (Applied Biosystem, Austin, TX). 18S was used for normalization and for relative quantification of gene expression.

#### Western Blot Analysis

Samples for Western blot analyses were diluted to a concentration of 20 μg of protein per 15 μL and heated at 70°C for 10 min. Membranes were imaged using a LiCor Odyssey scanner. Boxes were manually placed around each band of interest, which returned near-infrared fluorescent values of raw intensity with intralane background subtracted using Odyssey 3.0 analytical software (LiCor, Lincoln, NE). The following antibodies were used: anti-NLRP3 (Cryo-2, AdipoGen, San Diego, CA) and anti-IL-17RA, anti-IL-22RA1, and anti-β-actin (all from Abcam, Cambridge, U.K.).

#### Chromatin Immunoprecipitation Assay

Chromatin immunoprecipitation assays were performed as described in detail previously (16). Quantification of the precipitated DNA regions was performed by PCR. Primer sequences are listed for IL-1β promoter: 5'-TCCTCCCTTAGTGCCAACTATGT-3' (forward) and 5'-ACAGTCTCCACAGTTCTGCCATGT-3' (reverse) and tumor necrosis factor (TNF)-α 5'-GCTTCCTCCAGATGAGCTT-3' (forward) and 5'-TGCTGTCCTTGCTGAGGGA-3' (reverse). The following polyclonal antibodies were used: antipolymerase 2 (H224, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA), anti-NF-κB p65 (acetyl K310, Abcam), anti-C-Jun (AP-1; Abcam), and normal rabbit IgG (Santa Cruz).

### Caspase-1 Assay

Caspase-1 activity was assessed using the Caspase-1 Colorimetric Assay Kit (Abcam) according to the manufacturer's instructions.

### Cell Surface Marker and Intracellular Cytokine Staining

Pacific Blue or BV421-labeled anti-CD4 (RPA-T4, BD Biosciences, San Jose, CA), PerCP-Cy5.5-labeled anti-CD8 (RPA-T8, eBioscience), phycoerythrin (PE)-labeled anti-IL1-R1 (FAB269P, R&D Systems), and appropriate isotype controls were used to characterize freshly immunoselected adipose tissue CD3<sup>+</sup> cells. allophycocyanine-eFluor780-labeled anti-CD45 (HI30, eBiosciences), PE-Cy7-labeled anti-CD14 (M5E2, BD Biosciences), PE-labeled anti-IL-17RA (133617, R&D Systems), allophycocyanine-labeled anti-IL-22RA1 (305405, R&D Systems), and appropriate isotype controls were used to define receptor expression in CD14<sup>+</sup> cells. After 15 min incubation with Fc block (eBioscience), cells were suspended in fluorescence-activated cell sorter (FACS) buffer and stained with appropriate antibodies or isotype controls for 30 min at 4°C in the dark. Intracellular cytokine analysis of CD3<sup>+</sup> cells was performed in cells stimulated with phorbol-12-myristate-13-acetate (30 ng/mL; Sigma-Aldrich) and ionomycin (1 µg/mL; Alexis Biochemicals, San Diego, CA) at 37°C for 6 h with GolgiStop (BD Biosciences). Cells were then stained for CD4 and CD8 surface markers, permeabilized with Cytofix/Cytoperm solution (BD Biosciences), and incubated for 40 min at room temperature in the dark with PE-labeled anti-IL-17A (ebio64CAP17, eBioscience), fluorescein-isothiocyanate-labeled anti-IFN-γ (4S.B3, BD Biosciences), Alexa647-labeled anti-IL-21 (3A3-N2.1, BD Biosciences), or PE-Cy7-labeled anti-IL-22 (22URTI, eBioscience). Cells were washed twice with FACS buffer (PBS with 0.5% BSA and 2 mmol/L EDTA) after staining and then analyzed on a FACS LSRII flow cytometer (BD Biosciences) using FACS Diva software (BD Biosciences). Data analysis was performed with Flow Jo 9.4 software (Tree Star, Ashland, OR).

### Statistical Analyses

Data are shown as mean ± SEM. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software version 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Differences between two groups were determined by nonparametric paired Wilcoxon or unpaired Mann-Whitney comparative tests. Correlations were assessed by Pearson's test. For visual purpose, straight lines were added based on linear regression analysis. Differences were considered significant when  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### IL-1β Production by Adipose Tissue CD14<sup>+</sup> Macrophages

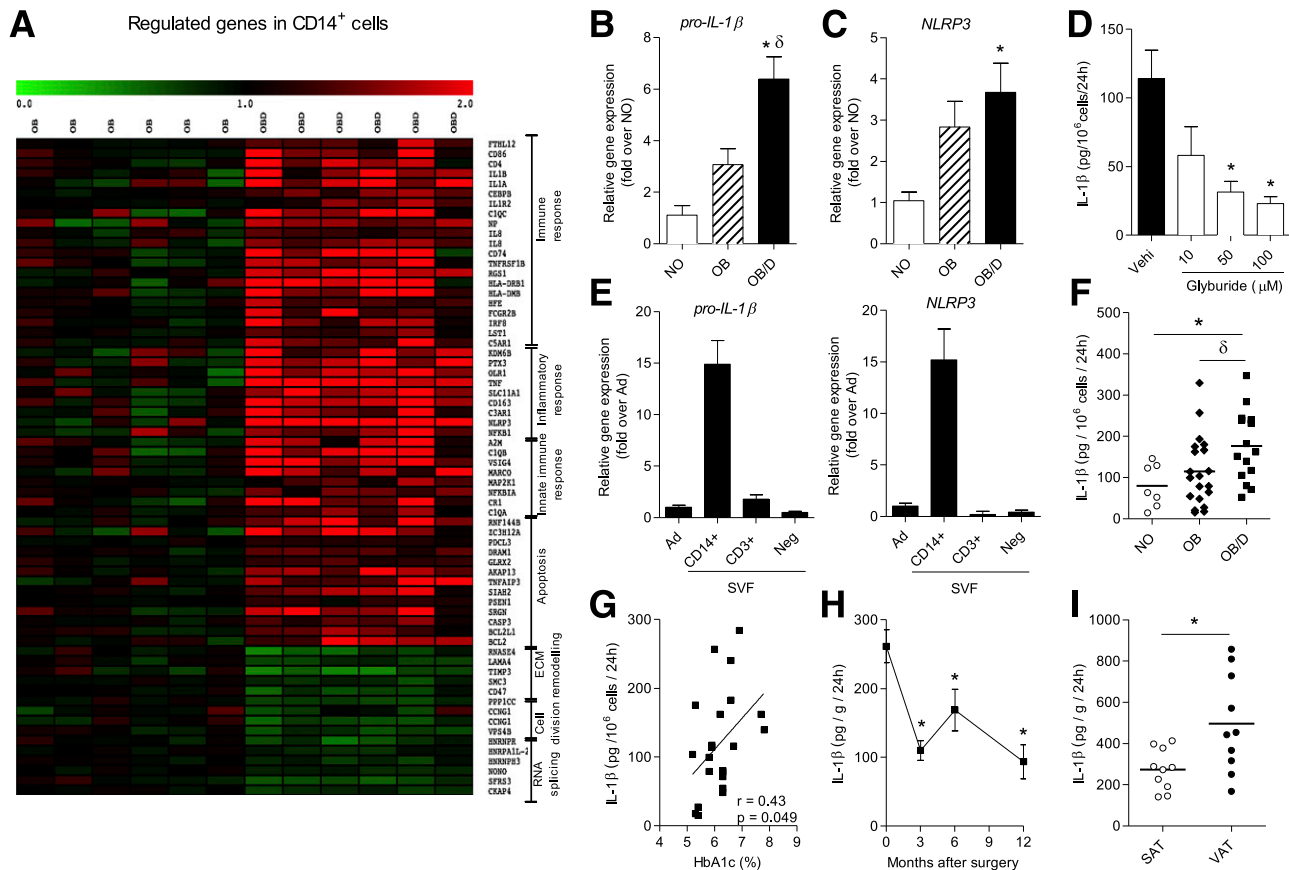
We performed genome-wide profiling of CD14<sup>+</sup> cells isolated from visceral adipose tissue of age- and sex-matched OB and OB/D subjects. In OB/D patients, 167 genes marked the expression pattern of adipose CD14<sup>+</sup> cells,

while 70 genes were characteristic of CD14<sup>+</sup> cells in non-diabetic OB individuals. Functional gene ontology annotation revealed that genes upregulated in CD14<sup>+</sup> cells from OB/D patients were mainly grouped in immune and inflammatory response pathways (Fig. 1A and Supplementary Fig. 1). *Pro-IL-1β* and *NOD-like receptor 3 (NLRP3)* were among the top 10 upregulated genes (Supplementary Fig. 1). We confirmed increased *pro-IL-1β* gene expression in adipose CD14<sup>+</sup> cells of OB/D versus OB in a larger group of subjects (Fig. 1B). *Pro-IL-1β* and *NLRP3* mRNA levels were threefold to sixfold higher in CD14<sup>+</sup> cells of OB/D than nonobese (NO) subjects (Fig. 1B and C). When adipose tissue CD14<sup>+</sup> cells were cultured in presence of the NLRP3 inhibitor glyburide, IL-1β release was dose-dependently inhibited (Fig. 1D), in line with the well-established requirement of NLRP3 for caspase-1-mediated processing of pro-IL-1β. Of note, TNF-α release was not significantly altered in the same culture experiments (Supplementary Fig. 2A). Supporting adipose tissue macrophages as the major cellular source of IL-1β, the CD14<sup>+</sup> cell-enriched fraction expressed 15-fold more *pro-IL-1β* and *NLRP3* mRNA than any other adipose tissue cellular fractions (Fig. 1E).

Several sets of observation support a relationship between adipose tissue IL-1β and altered glycemic status in human obesity. First, we showed that release of IL-1β was significantly higher in CD14<sup>+</sup> macrophages freshly isolated from adipose tissue biopsies of OB/D compared with NO or OB subjects (Fig. 1F) and was positively correlated with glycated hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>) values of the donor (Fig. 1G). Second, in a kinetic study of cytokines released by adipose tissue biopsies obtained surgically at month 3, 6, and 12 after RYGB, IL-1β release decreased steadily (Fig. 1H), while glycemic variables improved in obese subjects (Table 1). By contrast, TNF-α production in the same explants was not significantly changed with weight loss (Supplementary Fig. 2B). Finally, we found that IL-1β release was significantly higher in visceral than in subcutaneous adipose tissue (Fig. 1I), suggesting a prominent role of visceral adipose tissue linking IL-1β release to deterioration of glycemic status.

### IL-17<sup>+</sup> and IL-22<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T Cells in Adipose Tissue

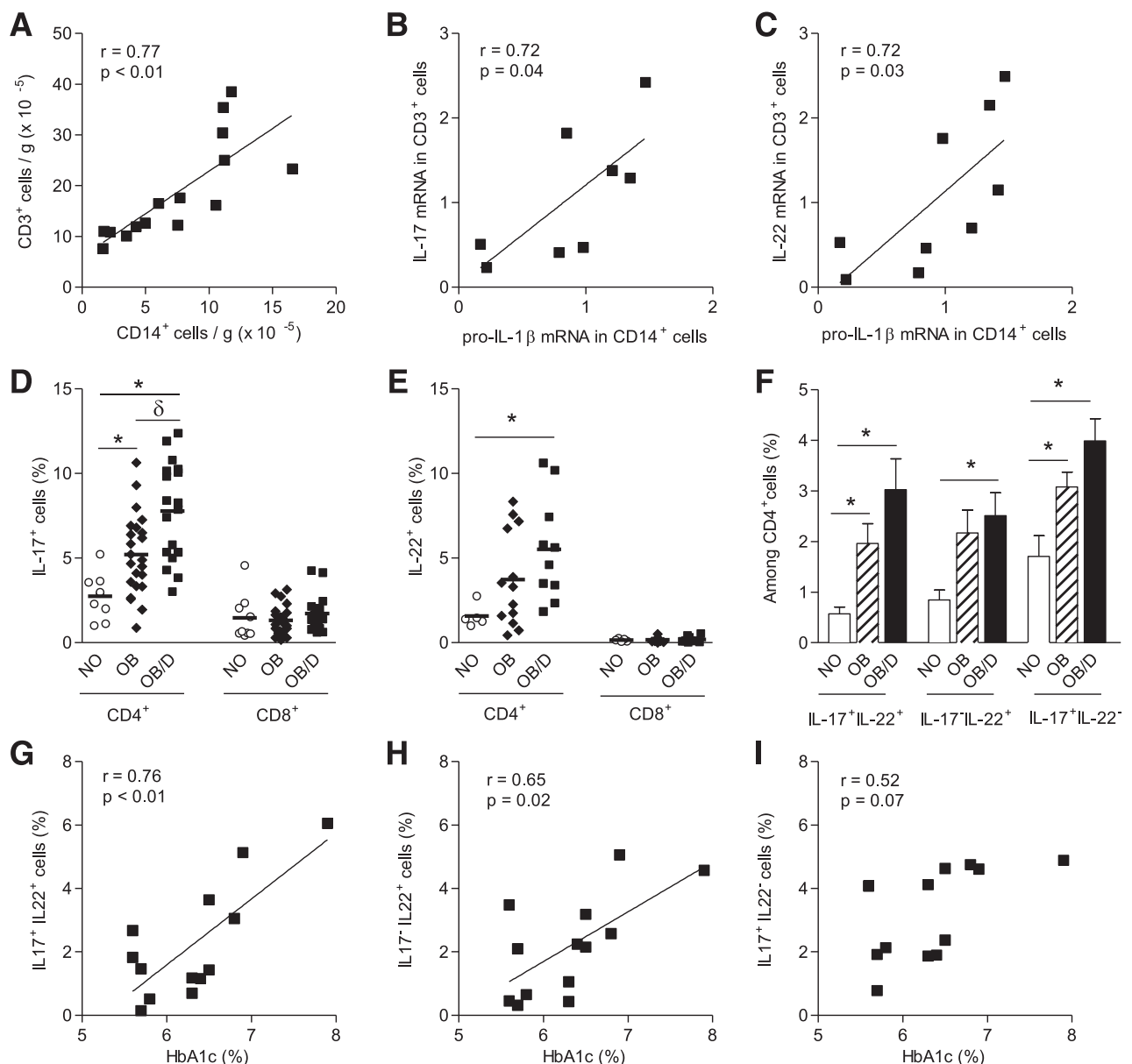
Considering that IL-1β is a master regulator of Th17 expansion in humans (17), we ought to identify adipose tissue T-cell populations potentially affected by increased IL-1β production in type 2 diabetic patients. In support of an inflammatory dialogue between macrophages and T cells in adipose tissue, the numbers of CD14<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup> cells isolated from the same biopsy were tightly correlated (Fig. 2A). To identify adipose tissue T-cells populations, we explored their cytokine signature, focusing on Th1 (IFN-γ) and Th17-related cytokines (IL-17 and IL-22). At gene level, the three cytokines were found to be expressed mostly in the CD3<sup>+</sup> cells enriched fraction (Supplementary Fig. 3). *Pro-IL-1β* mRNA in CD14<sup>+</sup> cells was strongly correlated with the levels of IL-17 and IL-22



**Figure 1**—Transcriptomic signature of adipose tissue CD14<sup>+</sup> cells in OB/D patients. **A**: Genome-wide mRNA expression analysis using microarrays was performed in visceral adipose tissue CD14<sup>+</sup> cells isolated from OB ( $n = 6$ ) and OB/D ( $n = 6$ ) subjects included in group 1. Age and BMI did not differ between the groups. Heat map representation of the genes significantly upregulated (red) or downregulated (green) in adipose tissue CD14<sup>+</sup> cells isolated from OB and OB/D subjects. Genes are ordered by gene ontology annotations. **B** and **C**: Quantitative PCR analyses of *pro-IL-1β* and *NLRP3* in CD14<sup>+</sup> cells isolated from adipose tissue of NO ( $n = 4$ ), OB ( $n = 16$ ), and OB/D ( $n = 12$ ) subjects. \* $P < 0.05$  versus NO;  $\delta P < 0.05$  versus OB. **D**: IL-1β production by CD14<sup>+</sup> cells isolated from adipose tissue of obese subjects ( $n = 5$ ) and treated with incremental doses of NLRP3-inhibitor glyburide. \* $P < 0.05$  versus vehicle using Wilcoxon matched pairs test. **E**: Quantitative PCR analyses of *pro-IL-1β* and *NLRP3* expression in cell fractions prepared from adipose tissue biopsies of obese subjects ( $n = 10$ ). **F**: IL-1β secretion by adipose tissue CD14<sup>+</sup> cells of NO ( $n = 7$ ), OB ( $n = 20$ ), and OB/D ( $n = 15$ ) subjects. Means are shown as horizontal line.  $\delta P < 0.05$  versus OB. **G**: Correlations between IL-1β production by adipose tissue CD14<sup>+</sup> cells isolated from obese subjects ( $n = 22$ ) and HbA<sub>1c</sub> (percentage). The  $r$  correlation coefficient and  $P$  values obtained by Pearson's test are indicated. **H**: Production of IL-1β by adipose tissue explants obtained from obese subjects at the time of RYGP surgery (month 0) and at months 3, 6 ( $n = 20$ ), and 12 ( $n = 9$ ). \* $P < 0.05$  versus month 0. **I**: Comparison of IL-1β production by subcutaneous and visceral adipose tissue explants obtained from the same obese subjects ( $n = 10$ ). \* $P < 0.05$  using Wilcoxon matched pairs test. All data are shown as mean  $\pm$  SEM. Ad, adipocytes; ECM, extracellular matrix; Neg, CD14<sup>−</sup>CD3<sup>−</sup> cells; SAT, subcutaneous adipose tissue; SVF, stroma vascular fraction; Vehi, vehicle; VAT, visceral adipose tissue.

gene expression in autologous T cells (Fig. 2B and C), suggesting coordinated regulation of these T-cell cytokines and IL-1β in the human adipose tissue. Further FACS analyses revealed a high prevalence of IFN-γ-expressing cells in both CD4<sup>+</sup> ( $83.7 \pm 1.1\%$ ;  $n = 50$ ) and CD8<sup>+</sup> ( $91.1 \pm 0.8\%$ ;  $n = 50$ ) subsets, whose frequencies were independent of BMI or glycemic status (data not shown). Although less abundant, IL-17- and IL-22-producing cells increased in percentage within the CD4<sup>+</sup> population in OB compared with NO subjects, with an additional effect of type 2 diabetes on IL-17<sup>+</sup> cell prevalence (Fig. 2D and E). A small proportion of CD8<sup>+</sup> cells was IL-17 or IL-22 positive, with no change according to the donor's weight

or glycemic status. Of note, T cells producing IL-21, an additional typical Th17-like cytokine, were not detected in human adipose tissue (data not shown). Thorough analysis of adipose CD4<sup>+</sup> cell subsets showed that the percentages of single IL-17<sup>+</sup>-IL-22<sup>−</sup> and IL-17<sup>+</sup>-IL-22<sup>+</sup> cells and double IL-17<sup>+</sup>-IL-22<sup>+</sup> cells all increased with obesity (Fig. 2F) and in the relation with glycemic deterioration assessed by increased HbA<sub>1c</sub> values (Fig. 2G–I). These data identify CD4<sup>+</sup> T-cell populations characterized by IL-17<sup>+</sup> and/or IL-22<sup>+</sup> production that accumulate in visceral adipose tissue along with macrophages and are likely to contribute to altered glycemic status in obese subjects.

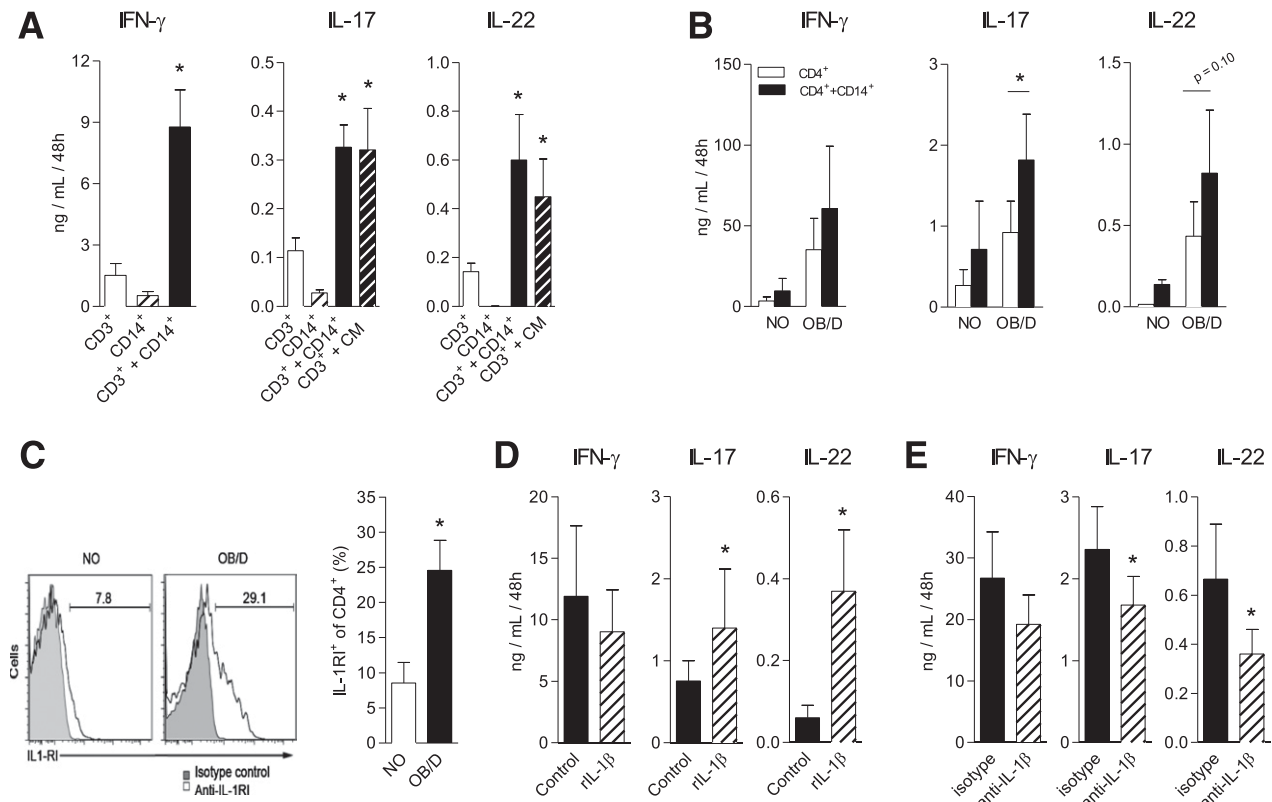


**Figure 2**—Increased prevalence of IL-17- and IL-22-producing CD4<sup>+</sup> T cell in the adipose tissue of OB/D patients. **A**: Positive correlation between the number of CD14<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup> cells isolated from the same visceral adipose tissue biopsy ( $n = 15$ ). Correlation between (**B**) *pro-IL-1 $\beta$*  and *IL-17* or (**C**) *IL-22* gene expression in adipose tissue of OB subjects ( $n = 8$ –9). Percentages of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells producing (**D**) IL-17 and (**E**) IL-22 in NO ( $n = 5$ –9), OB ( $n = 13$ –24), and OB/D ( $n = 10$ –18) subjects. Means are shown as horizontal line. \* $P < 0.05$  versus NO;  $\delta P < 0.05$  versus OB. **F**: Percentages of CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup>IL-22<sup>+</sup>, IL-17<sup>+</sup>IL-22<sup>+</sup>, and IL-17<sup>+</sup>IL-22<sup>+</sup>-producing cells in NO ( $n = 5$ ), OB ( $n = 13$ ), and OB/D ( $n = 10$ ) subjects. Data are mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  versus NO. Correlations between the percentages of (**G**) CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup>IL-22<sup>+</sup>, (**H**) IL-17<sup>+</sup>IL-22<sup>+</sup>, or (**I**) IL-17<sup>+</sup>IL-22<sup>+</sup>-producing cells and HbA<sub>1c</sub> in OB subjects ( $n = 12$ –13). The  $r$  correlation coefficients and  $P$  values obtained by Pearson's test are indicated.

### Cytokine Dialogue Between Macrophages and T Lymphocytes in Adipose Tissue

We next performed coculture experiments to specify a potential cytokine dialogue between adipose CD14<sup>+</sup> and T cells. The presence of CD14<sup>+</sup> macrophages enhanced by threefold to sixfold the production of IFN- $\gamma$ , IL-17, and IL-22 by autologous CD3<sup>+</sup> T cells (Fig. 3A). This stimulatory effect on IL-17 and IL-22 release was reproduced by adipose CD14<sup>+</sup> cell conditioned media, emphasizing the

importance of paracrine over cell contact effects in our cocultures conditions. Addition of CD14<sup>+</sup> cells also increased IL-17 release by CD4<sup>+</sup> cells in OB/D subjects, with a similar trend for IL-22 release (Fig. 3B). In this experimental setting, the amounts of cytokines produced by CD4<sup>+</sup> T cells were systematically higher in OB/D than in NO subjects, although the differences did not reach statistical significance, due to a limited number of NO subjects.



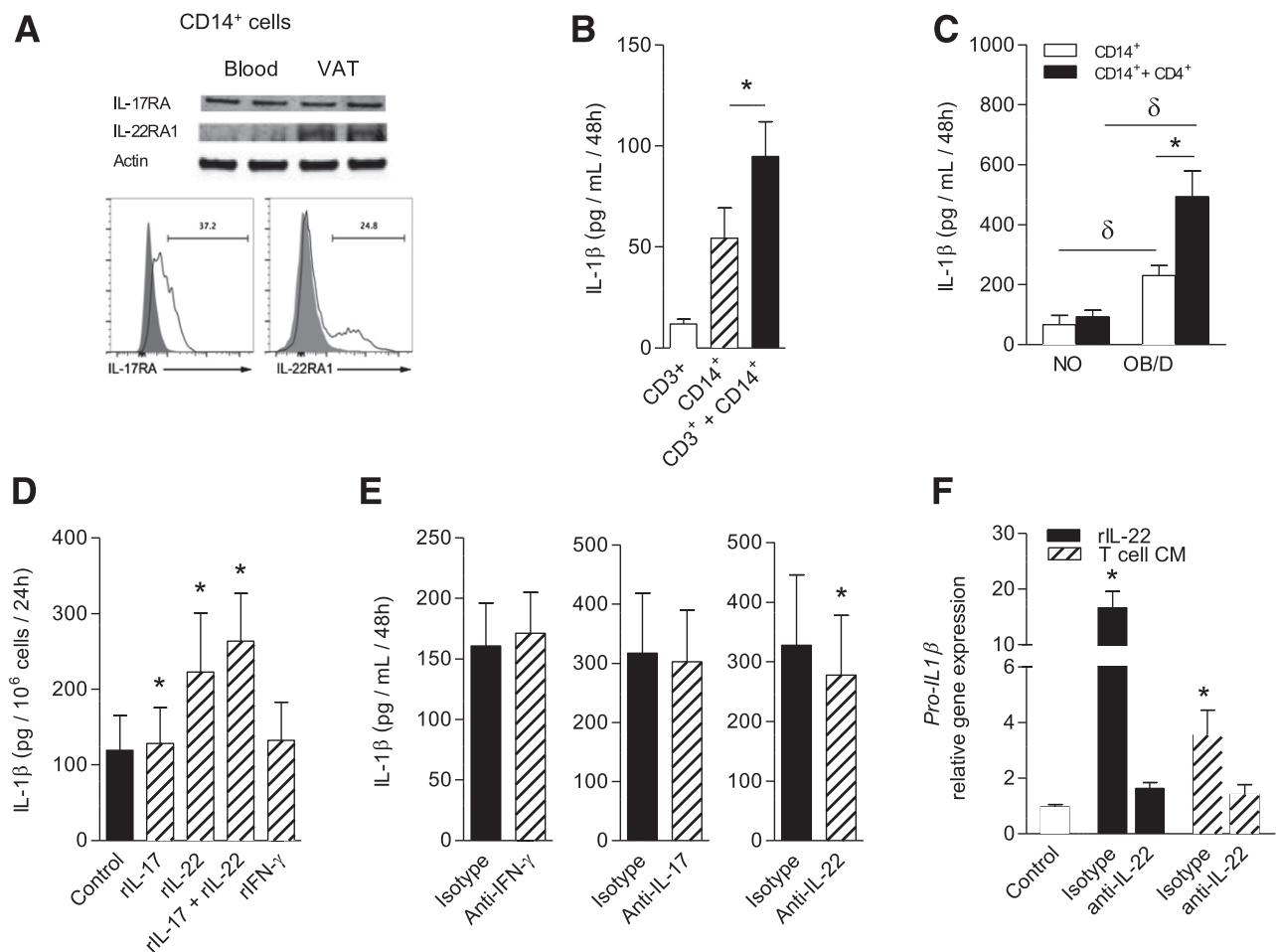
**Figure 3**—IL-1 $\beta$  selectively enhances IL-17 and IL-22 production in human adipose tissue. **A:** IFN- $\gamma$ , IL-17, and IL-22 production by adipose tissue CD3<sup>+</sup> cells cocultured with autologous adipose tissue CD14<sup>+</sup> cells or conditioned media upon anti-CD3/anti-CD28 activation in 10, 13, and 8 obese subjects, respectively. \* $P < 0.05$  versus CD3<sup>+</sup> cells alone using Mann-Whitney test. **B:** IFN- $\gamma$ , IL-17, and IL-22 production by adipose tissue CD4<sup>+</sup> T cells cocultured with autologous adipose tissue CD14<sup>+</sup> cells upon anti-CD3/anti-CD28 activation in NO ( $n = 2$ ) and OB/D ( $n = 3$ –5) subjects. \* $P < 0.05$  versus CD4<sup>+</sup> cells alone using Wilcoxon matched pairs test. **C:** Representative flow cytometry histogram of IL-1RI expression on adipose tissue CD4<sup>+</sup> cells from one NO subject and one OB/D subject. Numbers on the histogram profiles indicate the frequency (percentage) of IL-1RI<sup>+</sup> cells in total CD4<sup>+</sup> T cells. The graph shows the percentages of CD4<sup>+</sup> T cells expressing IL-1RI in adipose tissue of NO ( $n = 3$ ) and OB/D ( $n = 5$ ) subjects. \* $P < 0.05$  versus NO using Mann-Whitney test. **D:** IFN- $\gamma$  ( $n = 5$ ), IL-17 ( $n = 6$ ), and IL-22 ( $n = 6$ ) secretion in adipose tissue CD4<sup>+</sup> cells from obese subjects treated with recombinant human IL-1 $\beta$  for 48 h. \* $P < 0.05$  versus isotype control using Wilcoxon matched pairs test. **E:** IFN- $\gamma$  ( $n = 5$ ), IL-17 ( $n = 12$ ), and IL-22 ( $n = 12$ ) production by adipose tissue CD4<sup>+</sup> cells cocultured with autologous adipose tissue CD14<sup>+</sup> cells of obese subjects upon anti-CD3/anti-CD28 activation and in presence of isotype control or anti-IL-1 $\beta$  antibody as indicated. \* $P < 0.05$  versus control using Wilcoxon matched pairs test. All data are shown as mean  $\pm$  SEM. CM, conditioned media.

The role of IL-1 $\beta$  was first substantiated by the presence of IL-1 $\beta$ -signaling receptors (IL-1RI) on CD4<sup>+</sup> cells, which were detected in larger amounts in cells obtained from OB/D patients compared with NO (Fig. 3C). Then we determined the effects of rIL-1 $\beta$  and IL-1 $\beta$  neutralization on CD4<sup>+</sup> T-cell cytokine release. While IFN- $\gamma$  production was not significantly changed, the release of IL-17 and IL-22 was significantly increased upon rIL-1 $\beta$  treatment of CD4<sup>+</sup> T cells (Fig. 3D) and decreased by IL-1 $\beta$  neutralization in CD14<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> cocultures (Fig. 3E). These findings indicate that macrophage-derived IL-1 $\beta$  selectively alters the production of cytokines by adipose tissue CD4<sup>+</sup> T cells, increasing IL-17 and IL-22 release, with virtually no effect on IFN- $\gamma$ .

The receptors IL-17RA and IL-22RA1 were both detected on adipose tissue CD14<sup>+</sup> cells (Fig. 4A), suggesting that these cells are responsive to IL-17 and IL-22. Of note, the presence of IL-22RA1 on CD14<sup>+</sup> cells appears to be

adipose tissue specific, as circulating CD14<sup>+</sup> precursor monocytes did not express it (Fig. 4A). When cocultured with autologous CD3<sup>+</sup> cells, adipose tissue CD14<sup>+</sup> cells secreted twice as much IL-1 $\beta$  than when cultured alone (Fig. 4B). This stimulatory effect was observed in CD4<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> coculture of cells obtained from OB/D subjects, whereas it was not detected in cells from NO controls (Fig. 4C). The role of T-cell cytokines to drive IL-1 $\beta$  production was next explored in CD14<sup>+</sup> cells obtained from obese adipose tissue. rIL-22 was the most potent to promote IL-1 $\beta$  release in CD14<sup>+</sup> cells (Fig. 4D). A stimulatory effect of rIL-17, although significant, was much weaker and not synergistic with that of rIL-22. IFN- $\gamma$  did not increase IL-1 $\beta$  release in these primary cells. In CD4<sup>+</sup>-CD14<sup>+</sup> cocultures, IL-22 neutralization slightly but significantly reduced IL-1 $\beta$  secretion, while anti-IL-17 and anti-IFN- $\gamma$  antibodies were without effect (Fig. 4E). We further assessed the effect of IL-22 neutralization





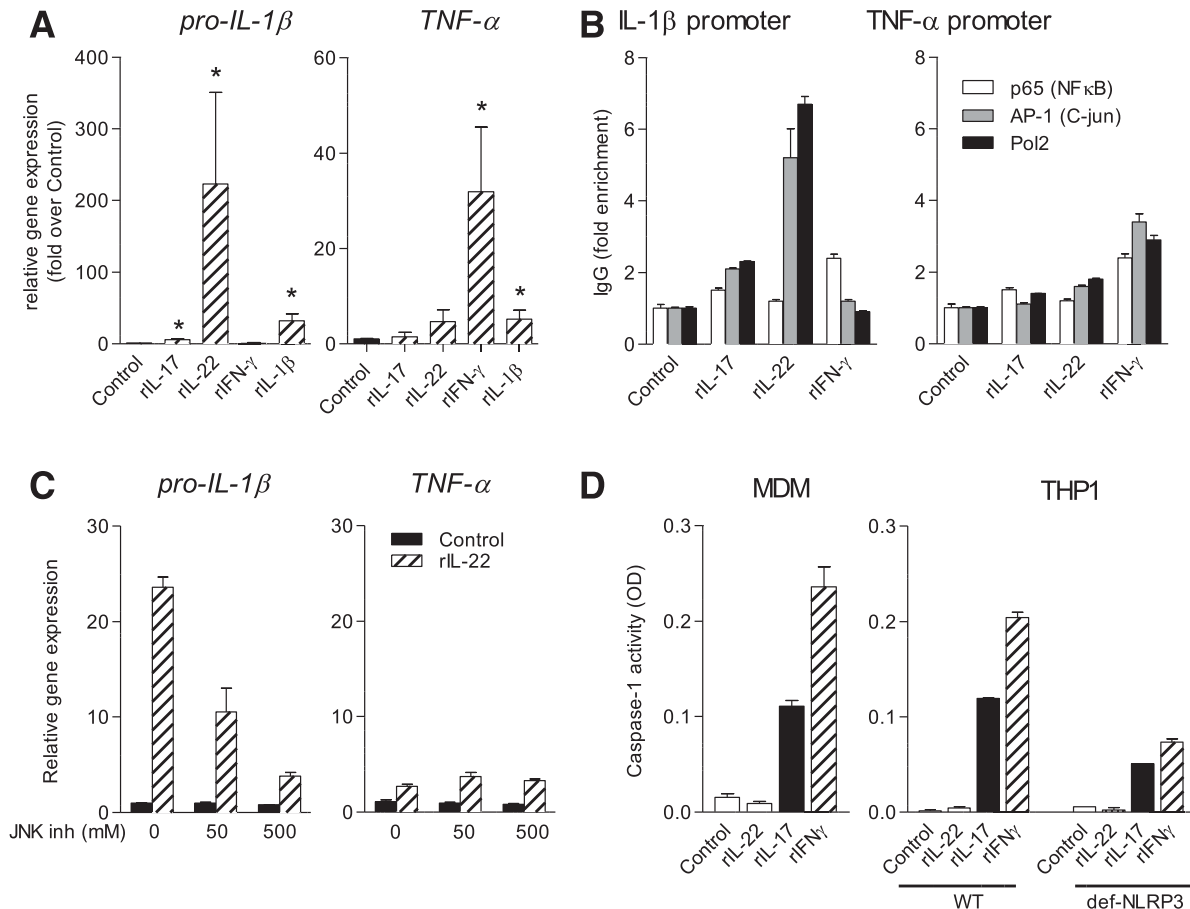
**Figure 4**—IL-22 increases IL-1 $\beta$  release by adipose tissue macrophages in OB/D patients. **A**: Protein levels of IL-17RA and IL-22RA1 in CD14 $^{+}$  cells isolated from peripheral blood mononuclear cells (blood) or visceral adipose tissue of obese subjects and representative flow cytometry histogram of IL-17RA and IL-22RA1 expression on adipose tissue CD14 $^{+}$  cells from one OB/D subject. **B**: IL-1 $\beta$  production by adipose tissue CD14 $^{+}$  cells cocultured with autologous adipose tissue CD3 $^{+}$  cells upon anti-CD3/anti-CD28 activation ( $n = 13$ ).  $^{*}P < 0.05$  versus CD14 $^{+}$  cells alone using Wilcoxon matched pairs test. **C**: IL-1 $\beta$  production by adipose tissue CD14 $^{+}$  cells cocultured with autologous adipose tissue CD4 $^{+}$  cells upon anti-CD3/anti-CD28 activation in NO ( $n = 3$ ) and OB/D ( $n = 5$ ) subjects.  $^{*}P < 0.05$  versus CD14 $^{+}$  cells alone using Wilcoxon matched pairs test;  $\delta P < 0.05$  versus NO using Mann-Whitney test. **D**: IL-1 $\beta$  secretion from adipose tissue CD14 $^{+}$  cells stimulated with recombinant human IL-17 and IL-22 alone or combined or IFN- $\gamma$  for 24 h ( $n = 6$ ).  $^{*}P < 0.05$  versus control using Wilcoxon matched pairs test. **E**: IL-1 $\beta$  production by adipose tissue CD14 $^{+}$  cells cocultured with autologous CD4 $^{+}$  cells upon anti-CD3/anti-CD28 stimulation and in presence of anti-IFN- $\gamma$  ( $n = 5$ ), anti-IL-17 ( $n = 9$ ), or anti-IL-22 ( $n = 7$ ) neutralizing antibodies or isotype controls. Data are shown as mean  $\pm$  SEM.  $^{*}P < 0.05$  versus isotype control using Wilcoxon matched pairs test. **F**: *Pro-IL-1 $\beta$*  gene expression in MDM treated for 24 h with rIL-22 or T cell-conditioned media in presence of isotype control or anti-IL-22 neutralizing antibody as indicated ( $n = 5$ ).  $^{*}P < 0.05$  versus isotype using Mann-Whitney test. All data are shown as mean  $\pm$  SEM. CM, conditioned media; VAT, visceral adipose tissue.

on *pro-IL-1 $\beta$*  gene expression in MDM treated with rIL-22 or CD3 $^{+}$  conditioned media. In these experimental settings, anti-IL-22 antibody abolished the stimulatory effects of rIL-22 or T cell-conditioned media (Fig. 4F). These data support a new paracrine dialogue sustained by IL-22-driven IL-1 $\beta$  production in human adipose tissue macrophages.

#### IL-17 and IL-22 Target Distinct Molecular Pathways in Macrophages

To get insights into the molecular pathways triggered by T-cell cytokines to promote IL-1 $\beta$  production, we explored

their capacity to increase *pro-IL-1 $\beta$*  gene expression and caspase-1 activity in macrophages. In line with data in Fig. 4F, rIL-22 markedly increased *pro-IL-1 $\beta$*  mRNA in MDM, while a weaker or no stimulatory effect was found for rIL-17 and recombinant IFN (rIFN)- $\gamma$ , respectively (Fig. 5A). Beside, *pro-IL-1 $\beta$*  mRNA levels were increased by rIL-1 $\beta$ , in agreement with the cytokine self-stimulatory effect (18). As a control, *TNF- $\alpha$*  gene expression was mostly promoted by rIFN- $\gamma$ . Chromatin immunoprecipitation showed that the marked stimulatory effect of rIL-22 relied on the recruitment of AP-1 (C-Jun), but not NF- $\kappa$ B (p65), onto IL-1 $\beta$  promoter with a concomitant recruitment of polymerase 2



**Figure 5**—T-cell cytokines regulate IL-1 $\beta$  production through distinct pathways. **A**: Quantitative PCR analysis of *pro-IL-1 $\beta$*  and *TNF- $\alpha$*  expression in MDM treated with rIL-17, IL-22, IFN- $\gamma$ , or IL-1 $\beta$  ( $n = 4$ ). **B**: Recruitment of AP-1 (C-Jun), NF $\kappa$ B (p65), and polymerase 2 onto the IL-1 $\beta$  or *TNF- $\alpha$*  promoter in MDM stimulated with rIL-17, IL-22, or IFN- $\gamma$ . **C**: Quantitative PCR analysis of *pro-IL-1 $\beta$*  and *TNF- $\alpha$*  expression in MDM treated for 24 h with rIL-22 in presence JNK inhibitor as indicated ( $n = 4$ ). **D**: Caspase-1 activity in MDM ( $n = 1$  in quadruplicate) and THP1 wild-type or NLRP3 deficient ( $n = 1$  in duplicate) in response to T-cell cytokines. def, deficient; inh, inhibitor; OD, optic density; POL2, polymerase 2; WT, wild-type. \* $P < 0.05$  vs. control using Mann-Whitney test.

(Fig. 5B). Stimulation by rIL-17 induced only a weak recruitment of these transcription factors onto IL-1 $\beta$  promoter. rIFN- $\gamma$  was efficient for their recruitment onto *TNF- $\alpha$*  promoter, but without effect on IL-1 $\beta$  promoter. The relevance of JNK pathways in promoting rIL-22-mediated *pro-IL-1 $\beta$*  transcription was supported by a dose-dependent inhibitory effect of SP600125 JNK inhibitor, which was observed on *pro-IL-1 $\beta$*  and not on *TNF- $\alpha$*  gene expression (Fig. 5C).

rIL-17- and rIFN- $\gamma$ -induced caspase-1 activity in MDM and THP1 macrophages, and these stimulatory effects were reduced in NLRP3-deficient cells (Fig. 5D and E). By contrast, rIL-22 was virtually without effect on caspase-1 activity. Additionally, JNK inhibitor had no effect on IL-17- and IFN- $\gamma$ -induced caspase-1 activation (data not shown). In sum, these data show that IL-22 promotes *pro-IL-1 $\beta$*  transcription through JNK pathway activation, while IL-17 or IFN- $\gamma$  may contribute to NLRP3/caspase-1 activation required for *pro-IL-1 $\beta$*  processing and IL-1 $\beta$  release in macrophages.

## DISCUSSION

Human obesity is a condition marked by changes in the immune cell composition of adipose tissue. While macrophages were initially considered major effectors, the contribution of T cells to adipose tissue inflammation is now established. The phenotyping of immune cells and their local interactions have remained largely unexplored in human adipose tissue, hampering potential translation into therapeutic strategies.

In the current study, we show here that the transcriptomic signature of adipose tissue macrophages was markedly influenced by altered glycemic status. Overexpression of genes functionally related to inflammatory and immune responses characterized macrophages of diabetic patients, where *TNF- $\alpha$*  and IL-1 $\beta$  were among the most upregulated genes. *TNF- $\alpha$*  has long been implicated in obesity-induced insulin resistance in rodent models (19). In our human population, the production of *TNF- $\alpha$*  by macrophages or adipose tissue explants was not strikingly



modulated by type 2 diabetes or RYGB-induced weight loss, whereas IL-1 $\beta$  was. Several experimental and clinical studies have stressed a pathological implication of IL-1 $\beta$  in obesity-induced alteration of glucose homeostasis (20–23). Blockade of IL-1 $\beta$  signaling improves glycemic status in mice with diet-induced obesity (24,25) and in type 2 diabetic patients (26–28). Our current data highlight the pathological relevance of increased local IL-1 $\beta$  production by adipose tissue macrophages in chronically deteriorated glycemic status, expanding the cellular targets of current anti-IL-1 $\beta$  therapies. While numerous cell types, including adipocytes, are known to process IL-1 $\beta$  (29), we show here that macrophages are the major source of IL-1 $\beta$  in human adipose tissue.

Investigating the cytokine signature of adipose tissue T lymphocytes, we found that increased frequencies of IL-17<sup>+</sup>-IL-22<sup>-</sup>, IL-17<sup>-</sup>-IL-22<sup>+</sup>, and IL-17<sup>+</sup>-IL-22<sup>+</sup> subpopulations of CD4<sup>+</sup> cells were characteristic of visceral adipose tissue of OB and OB/D subjects, in relation with deterioration of glucose homeostasis. This supports the relevance of this specific lymphocyte profile in obesity-related type 2 diabetes. In line with our observations, insulin-resistant obese patients were shown to display a greater percentage of lymphocytes producing IL-17 and IL-22 in their subcutaneous adipose tissue than metabolically normal obese or lean subjects (11).

In our study, the coincidental increase in macrophage-derived IL-1 $\beta$  and T cells producing IL-17 and IL-22 led to the hypothesis that these immune cells interact in adipose tissue. Primary cell cultures implemented with recombinant cytokine or neutralizing antibody revealed that IL-1 $\beta$  specifically promoted IL-22 and IL-17 production by adipose tissue CD4<sup>+</sup> cells. These two cytokines are established to induce inflammatory responses in various cell types (30–33). Thus the proinflammatory role of IL-1 $\beta$  in adipose tissue might be substantiated by indirect effects mediated in part through IL-17 and IL-22. Reciprocally, the presence of IL-17 and IL-22 signaling receptors, IL-17RA and IL-22RA1 (34,35), on adipose tissue CD14<sup>+</sup> cells suggest that these cells are responsive to a Th17-like environment. Of note, since IL-22RA1 is considered absent on hematopoietic cells (34), the unexpected expression of IL-22RA1 on CD14<sup>+</sup> cells might constitute a novel feature of visceral adipose tissue macrophages. The stimulatory effects of T-cell coculture or recombinant cytokines on CD14<sup>+</sup> cell-derived IL-1 $\beta$  argue for an effect of IL-22 and IL-17 to promote IL-1 $\beta$  release.

In the context of skin inflammation, both IL-17 and IL-22 stimulate NLRP3-dependent secretion of IL-1 $\beta$  from keratinocytes (36). In the human adipose tissue, our data support a prominent role for IL-22, mostly through C-Jun-mediated increase in *pro-IL-1 $\beta$*  transcription. The use of anti-IL-22 antibody was successful to abolish T cell-conditioned media-induced IL-1 $\beta$  expression in MDM, whereas the neutralizing effect was only marginal, although significant, in CD4<sup>+</sup>-CD14<sup>+</sup> coculture-mediated IL-1 $\beta$  release. A possible explanation is that an unknown

factor(s) reduced the efficiency of the antibody in our coculture conditions. IL-22 is known to mediate either proinflammatory or protective responses in different pathological conditions (reviewed elsewhere [37]). Our data suggest that IL-22 contributes to alter adipose tissue biology in type 2 diabetic patients, at least in part by increasing IL-1 $\beta$  local production. Interestingly, IL-1 $\beta$ , IL-17, and IL-22 have all been shown to promote anti-adipogenic responses and insulin resistance in adipocytes (33,38–40) likely to contribute to the development of type 2 diabetes in obese subjects. Whether or not these adipose tissue-derived cytokines also act at the systemic level remains to be defined.

In our cellular experiments, IFN- $\gamma$  release was stimulated by the presence of adipose tissue CD14<sup>+</sup> cells, but its production was not affected by rIL-1 $\beta$  or neutralizing anti-IL-1 $\beta$  antibody. Additional factors might stimulate IFN- $\gamma$  secretion in adipose tissue, including adipocyte-derived soluble mediators, such as free fatty acids and leptin (41) or the Th1-promoting cytokine IL-18 (42). We further observe that IFN- $\gamma$  increased NLRP3-dependent caspase-1 activity in adipose tissue macrophages, in line with its reported effect to increase *caspase-1* gene expression in human pancreatic islets (43). High level of adipose tissue IFN- $\gamma$  might also act locally as a negative regulator of IL-1 $\beta$  expression since it is known to inhibit IL-1 $\beta$  self-amplification at the transcription level in human peripheral blood mononuclear cells (18). Further studies are warranted to unravel the pathological relevance of IFN- $\gamma$  in human adipose tissue.

This study was performed mostly in primary human cells immunoselected from adipose tissue with some inherent limitations. First, freshly isolated macrophages might be in a highly activated state. Ex vivo caspase-1 “over-activation” could explain the limited effect of IL-17 to promote IL-1 $\beta$  secretion in these primary cells compared with MDM or THP1 macrophages. Second, we do not rule out the possibility that adipose tissue CD14<sup>+</sup> cell fraction comprises a minor subpopulation of myeloid CD14<sup>+</sup> dendritic cells (44). Third, cocultures were performed in presence of anti-CD3 and anti-CD28 antibody to minimize cell contact mediated by antigen presentation or CD80/CD86, respectively. However, this experimental setting does not preclude cell contact relying on other costimulatory molecules (e.g., CD40/CD40L). Given that CD14<sup>+</sup> cells or conditioned media produced a similar amount of stimulation of IL-17 and IL-22 release, it is likely that cell contact does not play a major role in these coculture conditions. However, we cannot rule out that cell contact mediated signaling pathways contribute to this inflammatory dialogue in vivo.

In this study exclusively performed in human samples, we cannot infer a causal relationship between obesity-induced type 2 diabetes and macrophage-derived IL-1 $\beta$  or CD4<sup>+</sup> T cell-derived IL-17/IL-22. This represents a well-known limitation of human investigation. Recent observations that cytokine production in mouse adipose tissue does not reflect the human situation, for example, with

virtually no IL-22 production (40), dampens the usefulness of mouse models in this specific context. The promising example of IL-1 $\beta$  blockade as being the most advanced immune intervention in patients with type 2 diabetes (45) strengthens our observations.

Our primary cell cultures were performed with cells isolated from visceral adipose tissue. It remains to be determined if a similar interplay between T cells and macrophages takes place at other locations. Of note, excess visceral adiposity is defined as the most proinflammatory fat depot and is widely accepted as a better correlate of metabolic abnormalities than the amount of subcutaneous adipose layer (46). In support of this idea, IL-1 $\beta$  production was higher in visceral than in subcutaneous adipose tissue of the same subject.

In summary, our data support a feed-forward proinflammatory loop between macrophages and CD4<sup>+</sup> T cells prominently mediated by IL-1 $\beta$  and Th17-related IL-22 within human visceral adipose tissue. Association of both macrophage-derived IL-1 $\beta$  and frequencies of Th17 cells with obesity-induced deterioration of glycemic variables enlightens the pathological relevance of this interplay. We provide an additional rationale for targeting IL-1 $\beta$  in obesity-linked type 2 diabetes through dampening this local proinflammatory loop. While early clinical data now describe the promising effect of IL-17 blockade in numerous autoimmune diseases (47), this study opens new avenues to the conception of innovative combinatorial anti-IL-1 $\beta$  and anti-IL-22 immunotherapy in human obesity.

**Acknowledgments.** The authors thank the contribution of the surgeons J.-L. Bouillot, N. Veyrie, and L. Hannoun, Hôtel-Dieu Hospital, Paris, France, for patient biopsies sampling during gastric surgery; F. Marchelli, Pitié-Salpêtrière Hospital, Nutrition Department, Paris, France, for the patient database; P. Ancel and V. Pelloux, Inserm UMR-S 1166, for their skilled technical assistance; and D. Hugol and P. Bonjour, Hôtel-Dieu Hospital, Paris, France, for their contribution to immunochemistry. Cytometric acquisition was performed at the Centre d'Imagerie Cellulaire et de Cytométrie, Centre de Recherche des Cordeliers UMR-S 872, Paris, France. The Centre d'Imagerie Cellulaire et de Cytométrie is a member of the Université Pierre et Marie Curie Flow Cytometry network.

**Funding.** This work has benefited from a French government grant managed by the National Agency for Research (program "Investments for the Future" reference ANR-10-IAHU). The authors acknowledge financial support from the INSERM, Université Pierre et Marie Curie-Paris6, and Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (Programme and Contrat de Recherche Clinique: PHRC to KC and CRC P050318 to C.P.); French National Agency of Research (ANR, CONRAD to N.V.); and Region Ile-de-France CODDIM (to M.G.-M.). This work was supported by European Community Seventh Framework (ADAPT Health-F26-2008-2011 and FLIP-Fatty Liver: Inhibition of Progression LSHM-CT-2005-018734).

**Duality of Interest.** No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

**Author Contributions.** E.D., N.V., S.A., and M.G.-M. researched the data and wrote the manuscript. C.C. and I.C. researched data and contributed to discussion. C.P. and J.A.-W. managed the human samples and databases. S.L.-D., J.B., S.V.K., and K.C. contributed to study conceptualization and participated in writing and reviewing the manuscript. M.G.-M. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

## References

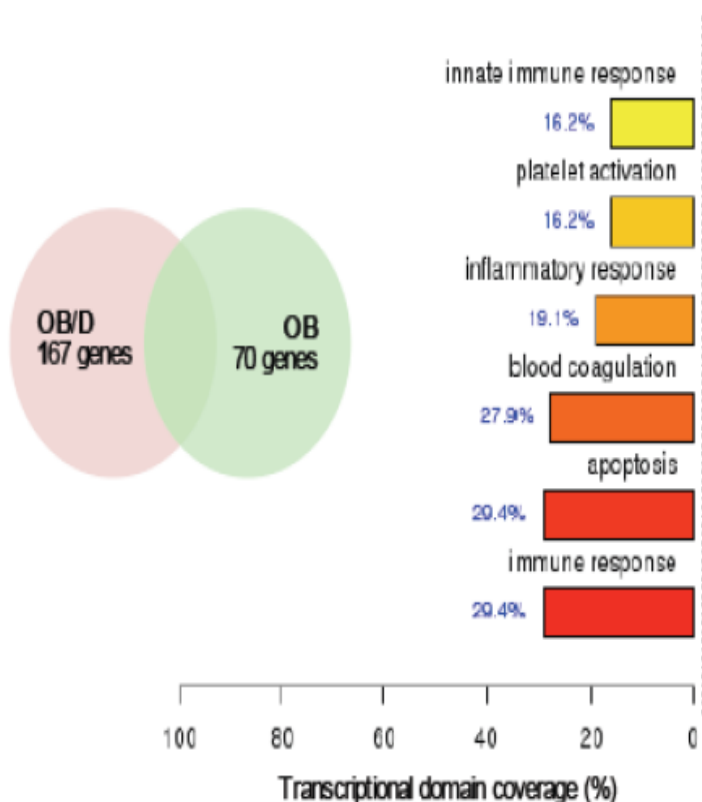
1. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 2006;116:1494–1505
2. Nomiya T, Perez-Tilve D, Ogawa D, et al. Osteopontin mediates obesity-induced adipose tissue macrophage infiltration and insulin resistance in mice. *J Clin Invest* 2007;117:2877–2888
3. Xu H, Barnes GT, Yang Q, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003;112:1821–1830
4. Apovian CM, Bigornia S, Mott M, et al. Adipose macrophage infiltration is associated with insulin resistance and vascular endothelial dysfunction in obese subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1654–1659
5. Klötting N, Fasshauer M, Dietrich A, et al. Insulin-sensitive obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;299:E506–E515
6. Tordjman J, Poitou C, Hugol D, et al. Association between omental adipose tissue macrophages and liver histopathology in morbid obesity: influence of glycemic status. *J Hepatol* 2009;51:354–362
7. Cipolletta D, Kolodin D, Benoist C, Mathis D. Tissue-resident Foxp3+CD4+ T cells that impact organometabolism. *Semin Immunol* 2011;23:431–437
8. Kintscher U, Hartge M, Hess K, et al. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1304–1310
9. Duffaut C, Galitzky J, Lafontan M, Bouloumié A. Unexpected trafficking of immune cells within the adipose tissue during the onset of obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;384:482–485
10. Bertola A, Ciucci T, Rousseau D, et al. Identification of adipose tissue dendritic cells correlated with obesity-associated insulin-resistance and inducing Th17 responses in mice and patients. *Diabetes* 2012;61:2238–2247
11. Fabbri E, Cella M, McCartney SA, et al. Association between specific adipose tissue CD4+ T-cell populations and insulin resistance in obese individuals. *Gastroenterology* 2013;145:366–374
12. Morris DL, Cho KW, Delproposto JL, et al. Adipose tissue macrophages function as antigen-presenting cells and regulate adipose tissue CD4+ T cells in mice. *Diabetes* 2013;62:2762–2772
13. Dalmas E, Rouault C, Abdenour M, et al. Variations in circulating inflammatory factors are related to changes in calorie and carbohydrate intakes early in the course of surgery-induced weight reduction. *Am J Clin Nutr* 2011;94:450–458
14. Taleb S, Lacasa D, Bastard JP, et al. Cathepsin S, a novel biomarker of adiposity: relevance to atherogenesis. *FASEB J* 2005;19:1540–1542
15. Prifti E, Zucker JD, Clement K, Henegar C. FunNet: an integrative tool for exploring transcriptional interactions. *Bioinformatics* 2008;24:2636–2638
16. Toubal A, Clément K, Fan R, et al. SMRT-GPS2 corepressor pathway dysregulation coincides with obesity-linked adipocyte inflammation. *J Clin Invest* 2013;123:362–379
17. Maddur MS, Miossec P, Kaveri SV, Bayry J. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *Am J Pathol* 2012;181:8–18
18. Schindler R, Ghezzi P, Dinarello CA. IL-1 induces IL-1. IV. IFN-gamma suppresses IL-1 but not lipopolysaccharide-induced transcription of IL-1. *J Immunol* 1990;144:2216–2222
19. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993;259:87–91
20. McGillicuddy FC, Harford KA, Reynolds CM, et al. Lack of interleukin-1 receptor I (IL-1RI) protects mice from high-fat diet-induced adipose tissue inflammation coincident with improved glucose homeostasis. *Diabetes* 2011;60:1688–1698

21. Stienstra R, van Diepen JA, Tack CJ, et al. Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108:15324–15329
22. Goossens GH, Blaak EE, Theunissen R, et al. Expression of NLRP3 inflammasome and T cell population markers in adipose tissue are associated with insulin resistance and impaired glucose metabolism in humans. *Mol Immunol* 2012;50:142–149
23. Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med* 2011; 17:179–188
24. Osborn O, Brownell SE, Sanchez-Alavez M, Salomon D, Gram H, Bartfai T. Treatment with an Interleukin 1 beta antibody improves glycemic control in diet-induced obesity. *Cytokine* 2008;44:141–148
25. Owyang AM, Maedler K, Gross L, et al. XOMA 052, an anti-IL-1beta monoclonal antibody, improves glucose control and beta-cell function in the diet-induced obesity mouse model. *Endocrinology* 2010;151:2515–2527
26. Cavelti-Weder C, Babians-Brunner A, Keller C, et al. Effects of gevokizumab on glycemia and inflammatory markers in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2012; 35:1654–1662
27. Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, et al. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 2007;356:1517–1526
28. Sloan-Lancaster J, Abu-Raddad E, Polzer J, et al. Double-blind, randomized study evaluating the glycemic and anti-inflammatory effects of subcutaneous LY2189102, a neutralizing IL-1 $\beta$  antibody, in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2013;36:2239–2246
29. Stienstra R, Joosten LA, Koenen T, et al. The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity. *Cell Metab* 2010;12:593–605
30. Barin JG, Baldeviano GC, Talor MV, et al. Macrophages participate in IL-17-mediated inflammation. *Eur J Immunol* 2012;42:726–736
31. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 2006;203:2271–2279
32. Sonnenberg GF, Nair MG, Kim TJ, Zaph C, Fouser LA, Artis D. Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. *J Exp Med* 2010;207:1293–1305
33. Ahmed M, Gaffen SL. IL-17 in obesity and adipogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010;21:449–453
34. Witte E, Witte K, Warszawska K, Sabat R, Wolk K. Interleukin-22: a cytokine produced by T, NK and NKT cell subsets, with importance in the innate immune defense and tissue protection. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010;21:365–379
35. Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, Nakae S. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity* 2011;34:149–162
36. Cho KA, Suh JW, Lee KH, Kang JL, Woo SY. IL-17 and IL-22 enhance skin inflammation by stimulating the secretion of IL-1 $\beta$  by keratinocytes via the ROS-NLRP3-caspase-1 pathway. *Int Immunol* 2012;24:147–158
37. Zenewicz LA, Flavell RA. Recent advances in IL-22 biology. *Int Immunol* 2011;23:159–163
38. Lagathu C, Yvan-Charvet L, Bastard JP, et al. Long-term treatment with interleukin-1beta induces insulin resistance in murine and human adipocytes. *Diabetologia* 2006;49:2162–2173
39. Zúñiga LA, Shen WJ, Joyce-Shaikh B, et al. IL-17 regulates adipogenesis, glucose homeostasis, and obesity. *J Immunol* 2010;185:6947–6959
40. Wang Z, Yang L, Jiang Y, et al. High fat diet induces formation of spontaneous liposarcoma in mouse adipose tissue with overexpression of interleukin 22. *PLoS One* 2011;6:e23737
41. Ioan-Facsinay A, Kwekkeboom JC, Westhoff S, et al. Adipocyte-derived lipids modulate CD4+ T-cell function. *Eur J Immunol* 2013;43:1578–1587
42. Barbulescu K, Becker C, Schlaak JF, Schmitt E, Meyer zum Büschenfelde KH, Neurath MF. IL-12 and IL-18 differentially regulate the transcriptional activity of the human IFN-gamma promoter in primary CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 1998;160:3642–3647
43. Karlén AE, Pavlovic D, Nielsen K, et al. Interferon-gamma induces interleukin-1 converting enzyme expression in pancreatic islets by an interferon regulatory factor-1-dependent mechanism. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85: 830–836
44. Ancuta P, Weiss L, Haeflner-Cavaillon N. CD14+CD16++ cells derived in vitro from peripheral blood monocytes exhibit phenotypic and functional dendritic cell-like characteristics. *Eur J Immunol* 2000;30:1872–1883
45. Donath MY, Dalmas E, Sauter NS, Böni-Schnetzler M. Inflammation in obesity and diabetes: islet dysfunction and therapeutic opportunity. *Cell Metab* 2013;17:860–872
46. Tchernof A, Després JP. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev* 2013;93:359–404
47. Patel DD, Lee DM, Kolbinger F, Antoni C. Effect of IL-17A blockade with secukinumab in autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* 2013;72(Suppl. 2):ii116–ii123

## SUPPLEMENTARY DATA

**Supplementary Figure 1.** Transcriptomic signature of adipose tissue CD14<sup>+</sup> cells from type 2 diabetic obese patients. Genome-wide mRNA expression analysis using microarrays was performed in adipose tissue CD14<sup>+</sup> cells isolated from obese (OB, n = 6) and type-2 diabetic obese (OB/D, n = 6) subjects. (A) Venn diagram depicts the number of genes specifically regulated in CD14<sup>+</sup> cells isolated from OB and OB/D subjects. The functional themes regulated in CD14<sup>+</sup> cells isolated from OB/D subjects represented by enriched annotating categories of Gene Ontology (GO) are shown. (B) Summary of the top 10 up-regulated genes in CD14<sup>+</sup> cells isolated from OB/D compared to OB subjects. FDR represents the False Discovery Rate. Genes were considered significantly regulated when FDR is < 5 %.

### A Transcriptomic signature of CD14<sup>+</sup> cells from OB/D

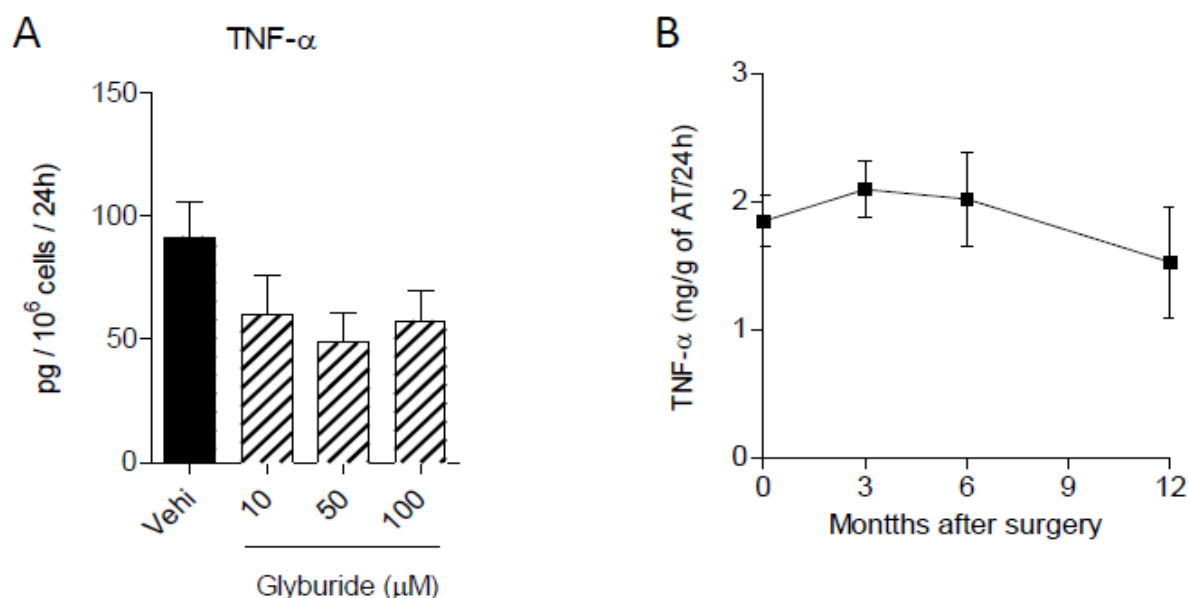


### B Top 10 inflammatory genes in CD14<sup>+</sup> cells

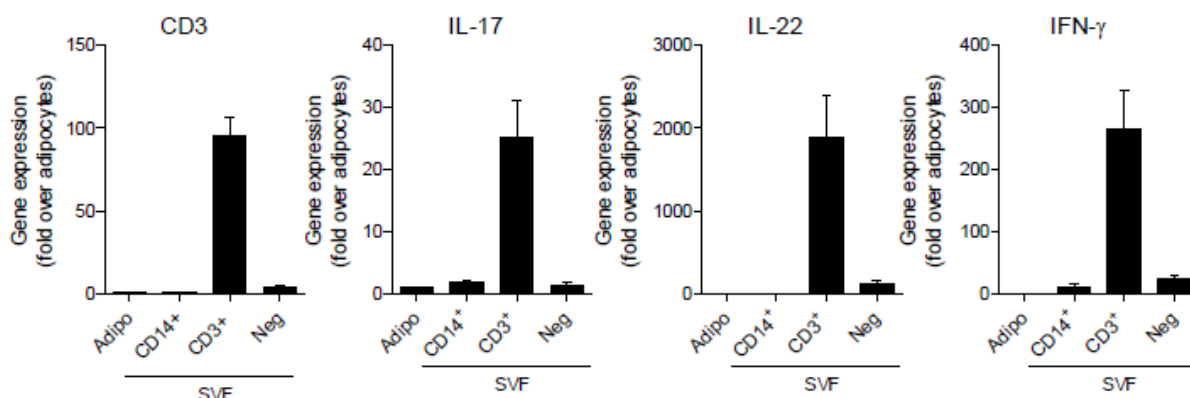
Gene	Ratio OB/D:OB	FDR (%)
<i>NLRP3</i>	2.83	4.06
<i>TNF</i>	2.28	2.75
<i>RGS1</i>	2.00	0.00
<i>PTX3</i>	1.97	4.06
<i>CD163</i>	1.95	0.00
<i>SLC11A1</i>	1.87	4.06
<i>IL1B</i>	1.75	4.95
<i>TANK</i>	1.70	4.06
<i>IL8</i>	1.54	4.95
<i>CEBPB</i>	1.48	0.00

## SUPPLEMENTARY DATA

**Supplementary Figure 2.** (A) NLRP-3-independent TNF- $\alpha$  production by adipose CD14<sup>+</sup> cells. CD14<sup>+</sup> cells were isolated from adipose tissue of obese subjects (n = 5) and treated with incremental doses of NLRP3-inhibitor glyburide. (B) TNF- $\alpha$  production by adipose tissue during RYGP-induced weight loss. Adipose tissue explants were obtained from obese subjects at the time of RYGP surgery (month 0) and at months 36 (n = 20) and 12 (n = 9). Data are shown as means  $\pm$  SEM.



**Supplementary Figure 3.** Expression of T cell cytokines in adipose CD3<sup>+</sup> cell enriched fraction. Quantitative PCR analyses of *CD3* and T cell cytokine gene expression in cellular fractions prepared from adipose tissue biopsies of OB subjects (n=10). Ad: adipocytes; Neg: CD14-CD3- cells; SVF: stroma vascular fraction.



## **II. Etude complémentaire : Rôle du microenvironnement du tissu adipeux sur l'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires centraux**

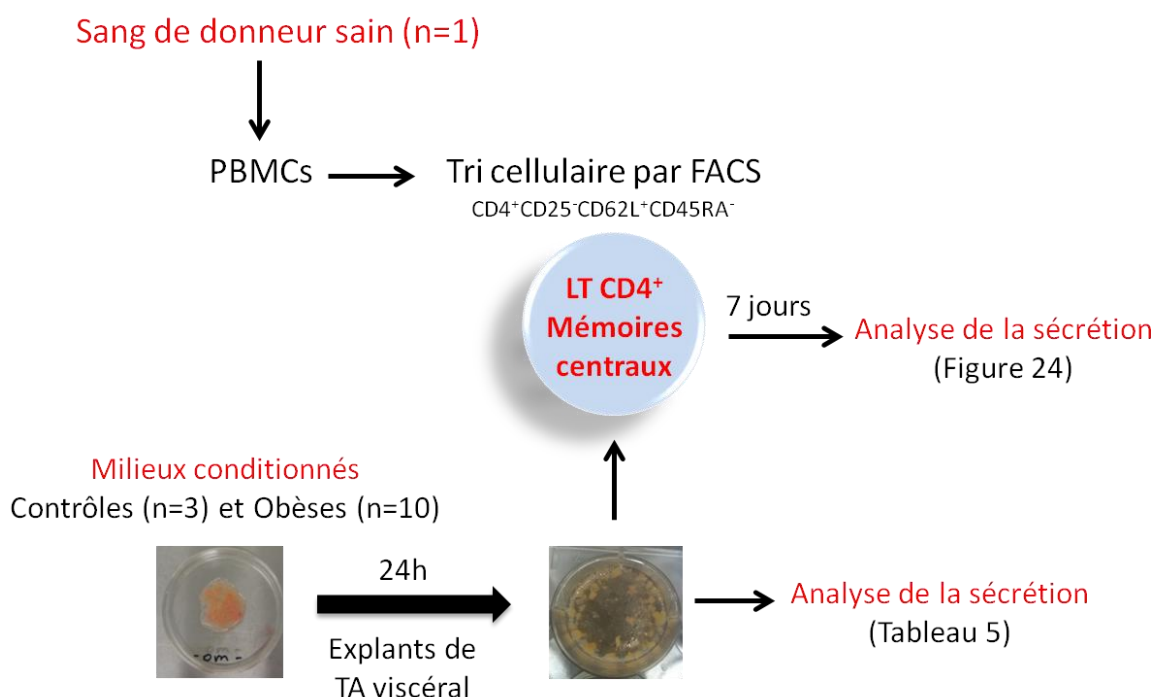
### Objectifs

Comme décrit dans l'introduction, les LT CD4<sup>+</sup> mémoires centraux (LT4 Cm) humains peuvent être activés en Th17 en présence d'IL-1 $\beta$ , principalement, et/ou d'IL-6 (Acosta-Rodriguez et al., 2007; Laurence and O'Shea, 2007; Yang et al., 2008 Nature). De plus, les LT4 Cm de type Th17 expriment fortement le récepteur CCR6 qui leur permet d'être recrutés dans les tissus sécrétant la chimiokine CCL20 (Baba et al., 1997; Hirota et al., 2007; Singh et al., 2008).

Ainsi, nous avons voulu savoir si le microenvironnement cytokinique du TA viscéral obèse pouvait sélectivement promouvoir le recrutement et l'activation des LT4 Cm.

### Matériels et méthodes

Pour cela, nous avons constitué une « banque » de milieux conditionnés d'explants de TA viscéral provenant d'individus minces et d'individus obèses. D'une part, nous avons quantifié leur profil de sécrétion cytokinique par Luminex, d'autre part, nous les avons mis en culture avec des LT4 Cm obtenus à partir du sang d'un individu sain. Les LT4 Cm ont été triés par cytométrie en flux sur la base de leur profil phénotypique CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>. Ils ont été cultivés dans du milieu X-Vivo + 2 % sérum durant 7 jours en présence d'anti-CD3/CD28 selon quatre conditions différentes : seuls, en présence de cytokines recombinantes IL-1 $\beta$  (12,5 ng/mL) et IL-6 (25 ng/mL) utilisées comme contrôle positif, et avec des milieux conditionnés d'explants de TA d'individus minces ou d'individus obèses. Finalement, la sécrétion des LT4 Cm après 7 jours de culture a été mesurée par Luminex (**Figure 23**).



**Figure 23 : Rôle du microenvironnement du tissu adipeux sur l'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires centraux**

### Résultats

Tout d'abord, on observe que le TA viscéral, mince ou obèse, sécrète peu de molécules inflammatoires détectables dans nos conditions de culture (**Tableau 5**). De plus, les quantités sécrétées sont assez faibles excepté celles de l'IL-6 et de CCL20. En outre, le TA obèse sécrète plus d'IL-6, de CCL20, de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$ , d'IL-2, mais également d'IL-10, par contre le TA mince sécrète un peu plus d'IL-33. De façon attendue, on peut noter une corrélation entre la sécrétion des molécules inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-1 $\beta$  et la CCL20 dans les milieux conditionnés d'explants de TA (**Figure 24**).

Ensuite, après avoir cultivé des LT4 Cm en présence de ces milieux conditionnés, on a constaté une augmentation simultanée de leur sécrétion d'IL-17A et d'IL-17F spécifiquement avec les milieux conditionnés d'explants de TA obèse (**Figure 25**). Finalement, cette sécrétion accrue d'IL-17 est corrélée avec l'état inflammatoire du TA obèse (**Figure 26**).

### Conclusion

Tout d'abord, notons le faible nombre de molécules inflammatoires sécrétées par les explants de TA viscéral obèse détectées dans nos conditions de culture : 7 sur 25.

Par contre, on observe une augmentation de CCL20 qui pourrait contribuer au recrutement des Th17 dans le TA obèse. De plus, l'augmentation de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-6 dans le TA obèse semble induire l'activation des LT4 Cm en Th17.

Ainsi, ces deux phénomènes pourraient en partie expliquer l'augmentation du pourcentage des LT CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> et la sécrétion accrue d'IL-17 que nous avons mises en évidence dans l'**Article 1**.

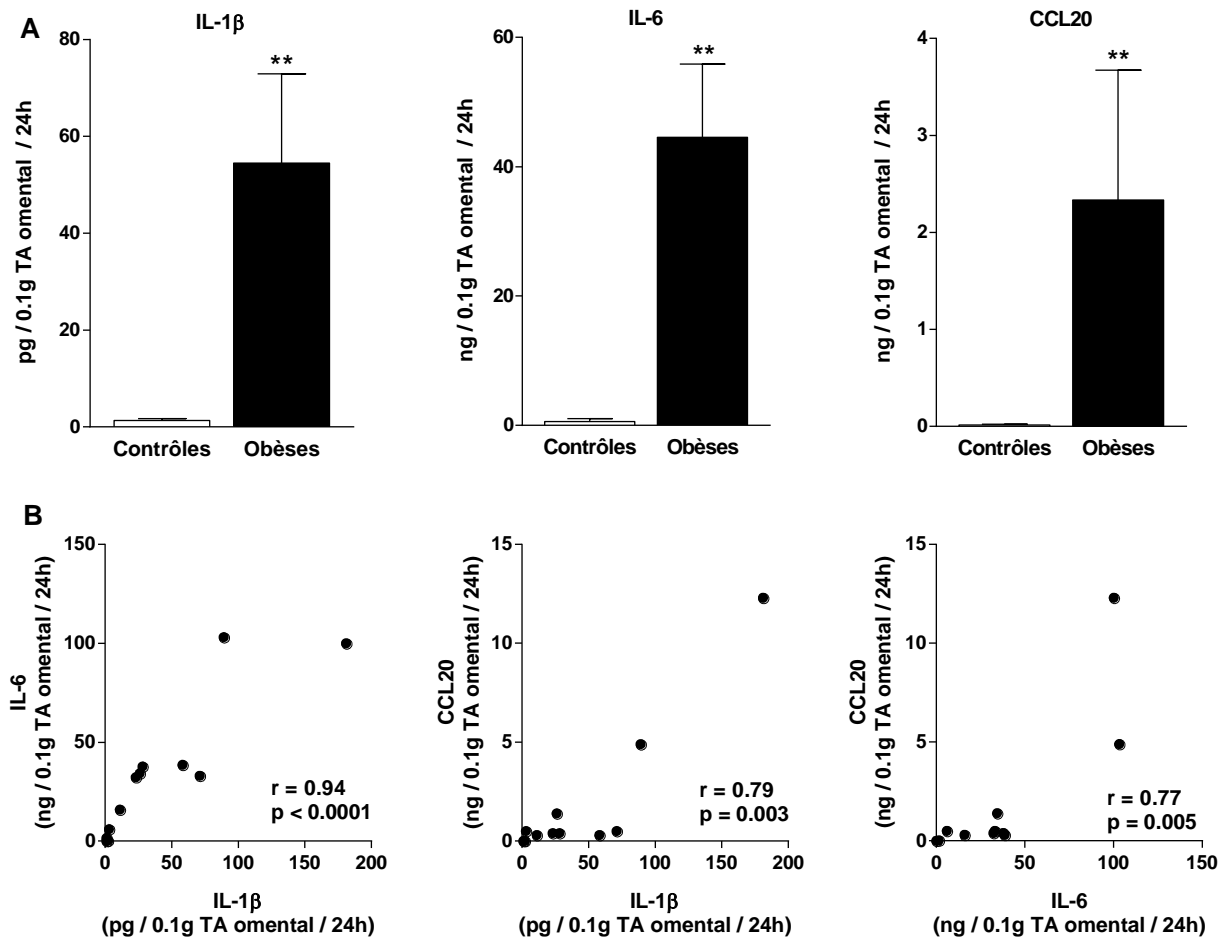
Finalement, cela nous pousse encore d'avantage à comprendre les différents rôles de cette cytokine sur la physiopathologie du TA obèse.



	Contrôles (n=3)	Obèses (n=10)
Molécules	pg / 0,1 g TA viscéral / 24h	
IL-6	585,5 ± 450,6	44405,4 ± 10155,8
CCL20	12,5 ± 12,5	2343,2 ± 1195,6
IL-10	0,7 ± 0,3	67,5 ± 15,8
TNF- $\alpha$	1,4 ± 1,1	57,4 ± 10,6
IL-1 $\beta$	0,8 ± 0,1	49,4 ± 17,3
IL-33	34,8 ± 20,3	9,5 ± 1,8
IL-21	0,6 ± 0,6	6,9 ± 0,5
GM-CSF	n.d	n.d
IFN- $\gamma$	n.d	n.d
IL-12	n.d	n.d
IL-13	n.d	n.d
IL-15	n.d	n.d
IL-17A	n.d	n.d
IL-17E	n.d	n.d
IL-17F	n.d	n.d
IL-2	n.d	n.d
IL-22	n.d	n.d
IL-23	n.d	n.d
IL-27	n.d	n.d
IL-28	n.d	n.d
IL-31	n.d	n.d
IL-4	n.d	n.d
IL-5	n.d	n.d
IL-9	n.d	n.d
TNF- $\beta$	n.d	n.d

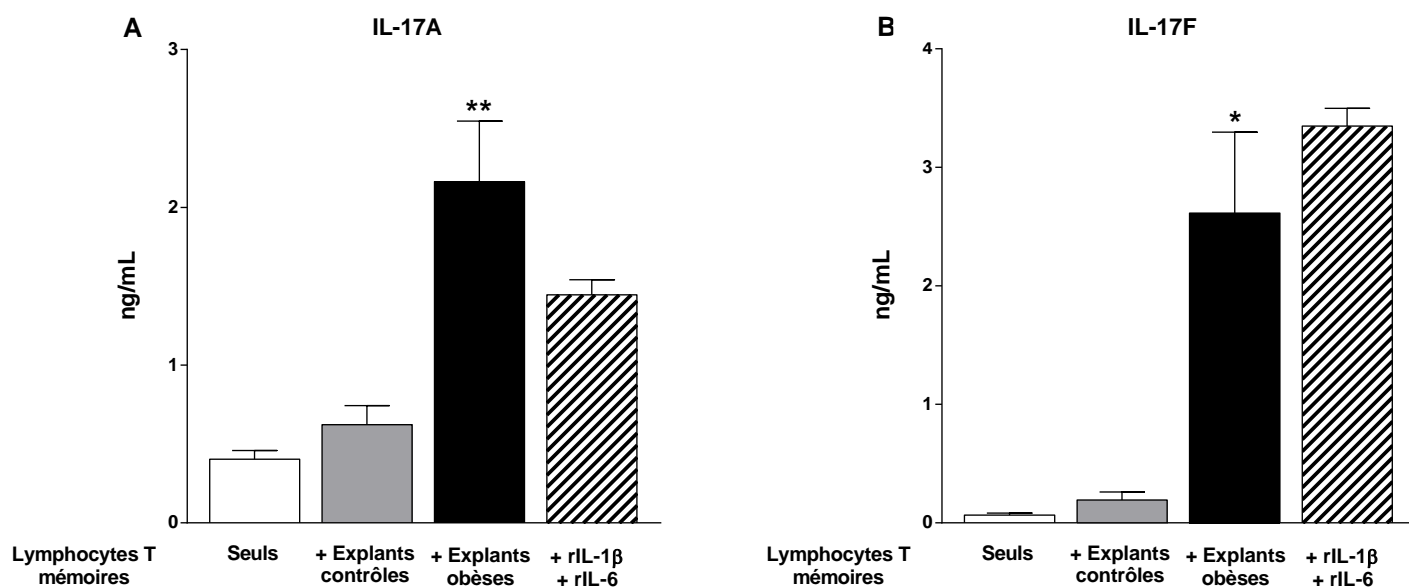
**Tableau 5 : Inflammation du tissu adipeux viscéral obèse**

Sécrétion d'explants de TA viscéral d'individus minces et obèses. Les données représentent la moyenne  $\pm$  SEM (TA : tissu adipeux, n.d : non détecté).



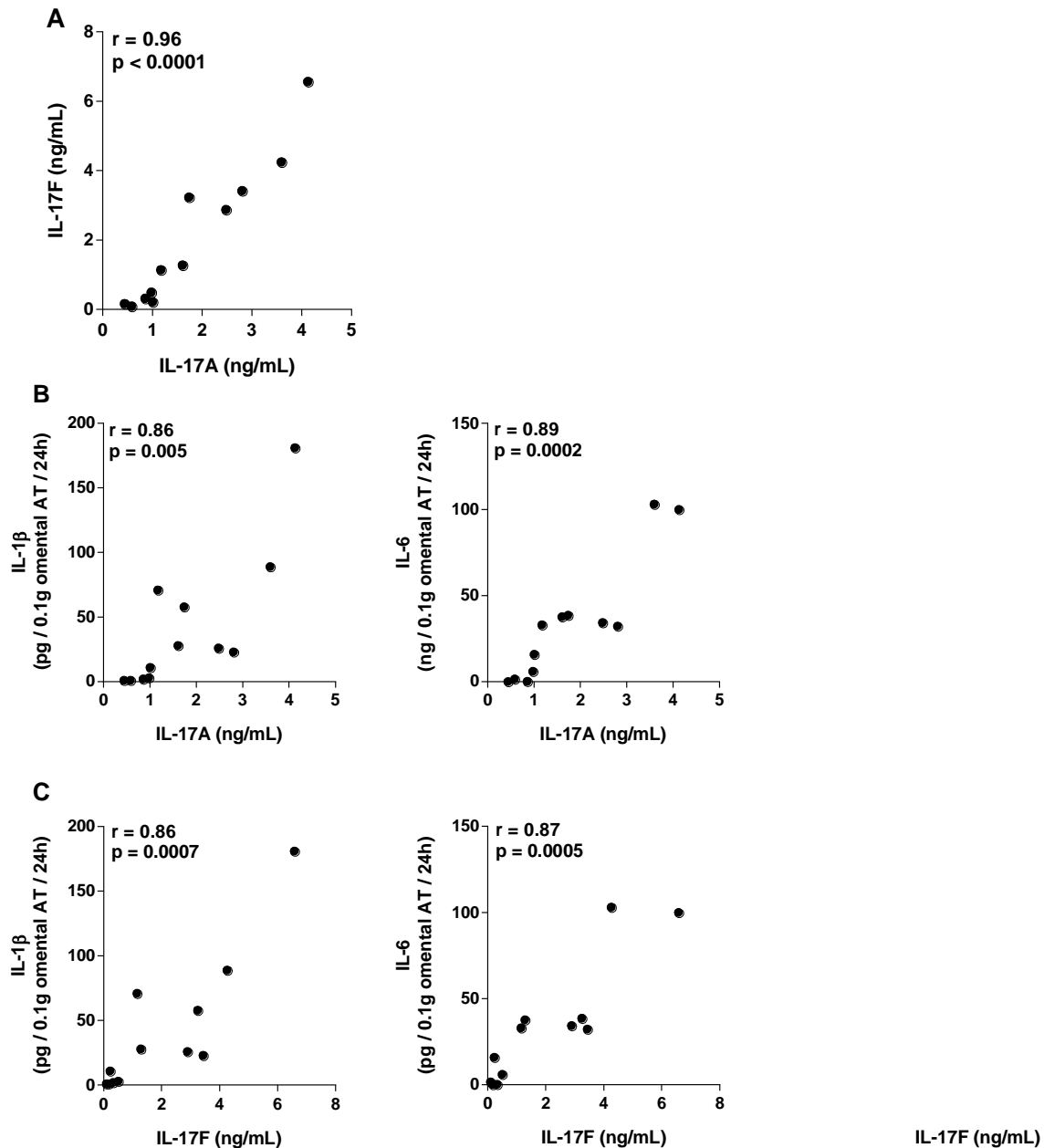
**Figure 24: Inflammation « collective » du tissu adipeux viscéral obèse**

(A) Sécrétion d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6 et de CCL20 par les explants de TA viscéral d'individus minces et obèses. (B) Corrélation entre les trois molécules. Les données représentent la moyenne  $\pm$  SEM (TA : tissu adipeux).



**Figure 25 : Activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires centraux en Th17 spécifiquement en présence d'explants de tissu adipeux viscéral obèse**

Sécrétion d'IL-17A et d'IL-17F par les LT4 Cm en fonction des conditions de culture. LT mémoires cultivés seuls (n = 1 en duplicate), en présence de cytokines recombinantes IL-1β (12,5 ng/mL) et IL-6 (25 ng/mL) (n = 1 en duplicate), ou en présence d'explants de TA viscéral d'individus non obèses contrôles (n = 3) ou d'individus obèses (n = 10). \**P* < 0,05 et \*\**P* < 0,01 comparé aux explants contrôles d'individus minces. Les données représentent la moyenne ± SEM.



**Figure 26 : Corrélation entre l'inflammation du tissu adipeux et l'activation de type Th17**

(A) Corrélation entre la sécrétion d'IL-17A et d'IL-17F par les LT4 Cm. (B) Corrélation entre la sécrétion d'IL-17A et d'IL-17F par les LT4 Cm et la sécrétion des explants de TA viscéral.



### III. Article 2 : Impact des cytokines IL-17 et IL-1 $\beta$ sur les cellules non-immunitaires du tissu adipeux

**Caer C\***, Rouault C\*, Poitou C, Aron-Wisnewsky J, Torcivia A, Bichet J-C, Clément K, Michèle Guerre-Millo M, André S. *Pro-inflammatory and catabolic effects of immune cell-derived cytokines in human adipose tissue*. **Soumis dans Int J Obes**. 2016

#### Objectifs

Après avoir observé une augmentation de la production d'IL-17, d'IL-22 et d'IL-1 $\beta$  dans le TA obèse, ainsi qu'un « dialogue » paracrine pro-inflammatoire entre les Th17 et les macrophages, le tout étant accentué par le DT2, nous avons tenté de mieux comprendre le rôle de ces trois cytokines dans la physiopathologie du TA en étudiant leur impact sur les trois principales cellules non-immunitaires du TA.

Pour cela, nous avons utilisé trois modèles de cellules primaires humaines, bien caractérisés au sein de notre laboratoire, les pré-adipocytes, les cellules endothéliales CD31<sup>+</sup> et les adipocytes matures cultivés en 3D dans un hydrogel, obtenues à partir de TA sous-cutané provenant de liposuction. Nous avons cultivé ces trois types cellulaires avec des cytokines recombinantes humaines ou en présence de milieu conditionné de cellules immunitaires CD45<sup>+</sup> obtenues à partir de TA viscéral obèse afin de refléter l'état physiopathologique cytokinique dans lequel se trouvent ces cellules au cours de l'obésité. Finalement, nos analyses ont porté sur trois altérations majeures du TA obèse que sont l'inflammation, la fibrose et le métabolisme adipocytaire.

#### Résultats

Tout d'abord, nous avons confirmé que l'IL-17 et l'IL-22 sont exclusivement exprimées dans les LT CD4<sup>+</sup>, alors que la pro-IL-1 $\beta$ , bien que très largement exprimée par les macrophages, est aussi exprimée dans les adipocytes matures et les cellules non-immunitaires, au sein du TA viscéral obèse.

En outre, l'expression des récepteurs IL-17RA et IL-1R1 sur nos trois modèles cellulaires nous a permis d'explorer les effets de l'IL-17 et l'IL-1 $\beta$ , contrairement à l'IL-22 dont le récepteur spécifique, l'IL-22RA1, n'est pas présent dans nos trois modèles cellulaires en culture.

De façon synthétique, l'IL-17 et IL-1 $\beta$  induisent :

- Une inflammation dans les trois types cellulaires.
- Une diminution des gènes du métabolisme adipocytaire.
- Pas de réelle fibrose sur les pré-adipocytes et les cellules endothéliales.

Les effets de ces deux cytokines, bien qu'allant dans le même sens, sont nettement plus prononcés avec l'IL-1 $\beta$ .

De façon intéressante, le milieu conditionné de cellules immunitaires CD45<sup>+</sup> reproduit les réponses pro-inflammatoires et cataboliques induites par les cytokines recombinantes spécifiquement dans les adipocytes. Enfin, ces effets néfastes sont efficacement inhibés en présence d'anticorps neutralisants anti-IL-17 et anti-IL-1 $\beta$ .

### Conclusion

Finalement, l'ensemble de ces résultats tend à argumenter pour un rôle pathologique de l'IL-1 $\beta$ , mais également de l'IL-17, dans le dysfonctionnement du TA induit par l'obésité. Pour cela, ces deux cytokines ont la capacité de favoriser l'inflammation dans les trois principales cellules non-immunitaires du TA et d'induire une diminution du métabolisme adipocytaire.

## **Pro-inflammatory and catabolic effects of immune cell-derived cytokines in human adipose tissue**

Charles Caër<sup>1,2,3\*</sup>, Christine Rouault<sup>1,2,3\*</sup>, Christine Poitou<sup>1,2,3,4</sup>, Judith Aron-Wisnewsky<sup>1,2,3,4</sup>, Adriana Torcivia<sup>5</sup>, Jean-Christophe Bichet<sup>6</sup>, Karine Clément<sup>1,2,3,4</sup>, Michèle Guerre-Millo<sup>1,2,3</sup> and Sébastien André<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> INSERM, UMR\_S 1166, Team 6 Nutriomics, F-75013, Paris, France;

<sup>2</sup> Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, UMR\_S 1166, F-75005, Paris, France;

<sup>3</sup> Institute of Cardiometabolism and Nutrition, ICAN, Pitié-Salpêtrière Hospital, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, F-75013, Paris, France;

<sup>4</sup> Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Pitié-Salpêtrière Hospital, Nutrition and Endocrinology Department, F-75013, Paris, France;

<sup>5</sup> Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Pitié-Salpêtrière Hospital, Hepato-biliary and Digestive Surgery Department, F-75013, Paris, France;

<sup>6</sup> Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Pitié-Salpêtrière Hospital, Plastic surgery and Mammary Cancer Department, F-75013, Paris, France.

\* These authors contributed equally to this work

**RUNNING TITLE** IL-17 and IL-1 $\beta$  alter adipose tissue homeostasis

### **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare no conflict of interest.

### **Corresponding author:**

Sébastien André,

UMR\_S 1166, Team 6 Nutriomics,

Institute of Cardiometabolism and Nutrition

91 boulevard de l'Hôpital, F-75013, Paris, France

E-mail: sebastien.andre@upmc.fr



## ABSTRACT

**BACKGROUND/OBJECTIVE:** Increased production of inflammatory cytokines contributes to disrupt adipose tissue biology in human obesity. We previously identified IL-1 $\beta$  and Th17-related cytokines as key players of an immune cell paracrine crosstalk leading to reciprocal amplification of their release in adipose tissue of obese subjects. The aim of the present study was to investigate the contribution of these cytokines to alter adipose tissue homeostasis.

**METHODS:** Pre-adipocytes, CD31<sup>+</sup> endothelial cells and primary adipocytes were isolated from human adipose tissue obtained in non-obese women undergoing lipoaspirate. We explored and confronted the effects of recombinant human cytokines, rIL-1 $\beta$  and rIL-17, on gene expression and pro-inflammatory factors release. Same analyses were conducted in response to conditioned medium of obese adipose tissue-derived CD45<sup>+</sup> immune cell, with or without anti-IL-1 $\beta$  and anti-IL-17 neutralizing antibodies.

**RESULTS:** rIL-1 $\beta$  and rIL-17 induced concordant pro-inflammatory transcriptional programs in the three human cell models and down regulated metabolic genes in adipocytes. The effects of rIL-1 $\beta$  were markedly more pronounced and not synergistic with those elicited by rIL-17 in the same cells. CD45<sup>+</sup> cell conditioned medium reproduced recombinant cytokine-induced pro-inflammatory and catabolic response in adipocytes. These effects were efficiently rescued upon IL-1 $\beta$  and IL-17 neutralization. Despite marked induction of matrix metalloproteinases by IL-1 $\beta$ , none of the recombinant cytokines or CD45<sup>+</sup> cell conditioned medium promoted major fibrotic alterations in pre-adipocytes and endothelial cells.

**CONCLUSIONS:** Our data enlighten a pathological implication of IL-1 $\beta$  and IL-17 to obesity-induced adipose tissue dysfunction, relying on their potential to promote inflammation in non-immune cells and metabolic deregulation in adipocytes. The prominence of IL-1 $\beta$  contribution to these adverse effects provides new rationale for anti-IL-1 $\beta$  immunotherapy in human obesity.

## INTRODUCTION

In obesity, adipose tissue is a site of marked immune cell accumulation, which maintains a state of chronic low-grade inflammation. Colonization occurs in absence of infection or autoimmune process, in response to positive energy balance and subsequent cellular injuries such as adipocyte hypertrophy. In turn, deregulation of adipose secretory and metabolic functions contributes to the development and/or maintenance of co-morbidities, including insulin resistance and type 2 diabetes. Macrophages are the most abundant immune cells, which accumulate and display phenotypic changes in hypertrophied adipose tissue. In the lean state, macrophages with a M2-like anti-inflammatory phenotype prevail, while adipose tissue colonization by pro-inflammatory macrophages is a hallmark of obesity.<sup>1-4</sup> Of note, the phenotype and function of adipose tissue macrophages, which display distinct characteristics in mice and human obesity, are still a matter of debate.<sup>5</sup>

Beside macrophages, numerous cell types from both the innate and adaptive arms of the immune system colonize adipose tissue, with ensuing pathological but also beneficial consequences (reviewed in<sup>6</sup>). Immune cells implicated in tissue dysfunction include CD8<sup>+</sup> T cells, mast cells, neutrophils, NK, B and  $\gamma\delta$  T cells, while Th2 and Tregs subsets, NKT cells, eosinophils or type 2 innate lymphoid cells are protective against obesity-induced adipose tissue inflammation. Recently, mucosal-associated invariant T cells (MAIT) were also described in human adipose tissue, where they exhibited a IL-17 profile in obese subjects.<sup>7</sup>

Cell-to-cell communication is crucial to ensure coordinated responses to environmental changes within tissues. Signaling mediators include direct cell-cell contact as well as secreted factors, such as cytokines, which are key components of paracrine dialogues. In the context of adipose tissue, pro-inflammatory macrophages are a prominent source of molecules with a potential to induce inflammatory, profibrotic and insulin resistant states in pre-adipocytes and adipocytes.<sup>8-12</sup> Cell cultures implemented with neutralizing antibodies enlightened a crucial role of TNF- $\alpha$ <sup>8,11</sup> and IL- $\beta$ <sup>13</sup> in mediating the deleterious effects of macrophage secreted factors. Mice and human studies showing that anti-TNF- $\alpha$ <sup>14,15</sup> or anti-IL-1 $\beta$ <sup>16-18</sup> immunotherapy improved glycemic status, support the implication of these inflammatory cytokines in linking adipose tissue inflammation to metabolic alterations. Other factors such as IL-6, prominently produced by pro-inflammatory macrophages, impaired insulin signaling and induced inflammation in 3T3-L1 murine adipose cell line.<sup>19,20</sup> In humans, IL-6 content decreased in the adipose tissue of obese women submitted to very low calorie diet and positively correlated with reduced whole body insulin sensitivity in obese subjects.<sup>21,22</sup> Collectively, these observations emphasize the pathological relevance of macrophage-derived pro-inflammatory cytokines to promote adipose tissue deregulation and to alter glucose homeostasis in obesity.

Among additional factors potentially involved in obesity-induced adipose tissue dysfunction, IFN- $\gamma$ , mostly produced by Th1 and CD8<sup>+</sup> T cells, has long been known to alter insulin signaling and lipid metabolism in adipose cells.<sup>23-26</sup> More recently, we and others revealed that a specific subset of Th17

lymphocytes accumulate in the adipose tissue in relation with deterioration of subjects' glycemic status.<sup>27-29</sup> Th17 cells produce specific cytokines, including IL-17 and IL-22. Using human adipose tissue-derived cells, we showed that IL-17 and prominently IL-22 target macrophages to increase the release of IL-1 $\beta$ , while, in turn, IL-1 $\beta$  enhanced the production of Th17 cytokines by CD4<sup>+</sup> T cells.<sup>29</sup> This pathway was amplified in type 2 diabetic subjects and attenuated after weight loss, congruent with concordant variations in glucose homeostasis. These human observations suggest that immune cell paracrine interactions, leading to reciprocal amplification of IL-1 $\beta$  and Th17 cytokines, are critical to promote a pro-inflammatory milieu in adipose tissue contributing to glycemic deterioration. However, it is not well established how these specific cytokines impinge upon adipose tissue non-immune cells. On the one hand, a deleterious action of IL-1 $\beta$  to induce inflammation and insulin resistance has been demonstrated in mouse and human cultured adipocytes.<sup>13,30,31</sup> Recently, a similar effect was attributed to IL-17, which was shown to impair insulin action in murine 3T3-L1 adipocytes.<sup>32</sup> Surprisingly, mice lacking IL-17 were not protected against high fat diet-induced insulin resistance and exhibited increased adiposity. In line IL-17 demonstrated an anti-adipogenic effect *in vitro*.<sup>32,33</sup> These observations are at odds with accumulation of Th17 cells in the adipose tissue of obese and diabetic obese subjects, suggesting species differences in the pathological relevance of Th17 cytokines.

The aim of the present study was therefore to substantiate and compare the effects of IL-1 $\beta$  and Th17 cytokines in primary non-immune cells isolated from human adipose tissue. To investigate this, human adipose tissue-derived pre-adipocytes, adipocytes and endothelial cells were cultured in presence of the two cytokines, alone or combined. Our data show that IL-1 $\beta$  and IL-17 induced concordant pro-inflammatory transcriptional programs in the three cell types and down regulated metabolic genes in adipocytes. The hierarchy between the two cytokines was established on the basis of a markedly more pronounced effect of IL-1 $\beta$  compared to IL-17 with no evidence for synergistic effects, whatever the pathway or cell type.

## MATERIALS AND METHODS

### Human adipose tissue

Omental adipose tissue biopsies were obtained during bariatric surgery in a population of 10 morbidly non-diabetic obese women (age  $42.2 \pm 2.6$  years; BMI  $43.1 \pm 1.6$  kg/m<sup>2</sup>; fat mass  $47.9 \pm 1.4$  %). Adipose tissue was dissociated by collagenase treatment and centrifuged to separate floating adipocytes from cells of the stroma vascular fraction (SVF). CD45<sup>+</sup> immune cells, CD4<sup>+</sup> T cells (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and CD14<sup>+</sup> macrophages (Stemcell Technologies, Vancouver, Canada) were independently isolated from SVF cells, using positive selection magnetic beads. CD45<sup>-</sup> non-immune cells were harvested during CD45<sup>+</sup> cells immunoselection. Cells were recovered in RLT Qiagen buffer and kept frozen until use. To obtain conditioned medium, CD45<sup>+</sup> cells were seeded  $1 \times 10^6$  per mL in RPMI 1640 (Lonza, Berkshire, U.K.) with 10% Fetal Bovine Serum, 1% penicillin-streptomycin, 1% sodium pyruvate and 1% NEAA and cultured for 48 h. A pool of 8 separate cell culture media was used for the experiments.

Non-immune cells were obtained from subcutaneous adipose tissue collected in 27 non-obese female subjects (age  $44.2 \pm 3.3$  years; BMI  $22.3 \pm 0.5$  kg/m<sup>2</sup>) undergoing lipoaspirate. Adipose tissue was submitted to collagenase digestion to recover adipocytes and SVF cells. Pre-adipocytes were selected from SVF cells grown in DMEM with 10% Fetal Bovine Serum and 1% penicillin-streptomycin after at least 2 passages to eliminate non pre-adipocyte cell contamination.<sup>11</sup> Endothelial cells were isolated from SVF cells by CD31<sup>+</sup> bead positive selection (Stemcell Technologies) and grown in ECGM medium (PromoCell, Heidelberg, Germany) as described in<sup>34</sup>. Floating adipocytes were incorporated immediately in hydrogel (Puramatrix, Corning, Bedford, MA, USA) for 3D setting according to the protocol described in<sup>35</sup>.

The study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration and approved by the Ethics Committee (CPP Ile-de-France 1). All obese subjects provided written informed consent when included in the surgery program (Fibrota NCT01655017).

### Adipose tissue non-immune cell culture

Pre-adipocytes were seeded in six well plates at  $4 \times 10^4$  cells per mL and cultured in DMEM/F12, supplemented with 1% penicillin-streptomycin and human insulin (5 nM). Endothelial cells were seeded in six well plates at  $4 \times 10^4$  cells per mL and cultured in ECBM (1% penicillin-streptomycin and 1% Bovine Serum Albumin fatty acid free) with or without cytokines. Adipocytes were embedded at a concentration of  $1 \times 10^5$  cells per mL of hydrogel preparation into 96-well plates containing 150  $\mu$ L of DMEM/F12, supplemented with 1% Bovine Serum Albumin fatty acid free, 1% penicillin-streptomycin and human insulin (5 nM).

Human recombinant cytokines, rIL-1 $\beta$ , rIL-17, rIL-22 (10 ng/mL; Miltenyi Biotec) and rTGF- $\beta$ 1 (5 ng/mL; Bio-Techne) were added, alone or combined, to cell culture medium. Pre-adipocytes and CD31<sup>+</sup> cells were cultured for 96 h and adipocytes for 72 h with medium replacement after 48 h. In

some experiments, CD45<sup>+</sup> immune cell conditioned medium was added at a dilution of 1 to 8 in cell culture medium in presence of isotype control (mIgG1 $\kappa$ , 2.55  $\mu$ g/mL) or anti-IL-1 $\beta$  (2.5  $\mu$ g/mL) and anti-IL-17 (50 ng/mL) neutralizing antibodies (eBioscience, San Diego, CA, USA). Culture media were recovered and kept frozen at -80°C until use. Pre-adipocytes and endothelial cells were harvested in RLT Qiagen buffer + 1%  $\beta$ -mercaptoethanol. Adipocytes were immediately lysed using QuantiGene Sample Processing kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA).

#### Gene expression and secretion studies

For RT-PCR analysis, total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). cDNAs were synthesized from and prepared with M-MLV reverse transcriptase (Promega, Fitchburg, WI, USA) and Superscript II reverse transcriptase (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Exiqon primers were used for quantitative Real-Time PCR using the 7300 real-time PCR system (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). Data were normalized according to the RPLP0 gene expression. QuantiGene Plex analysis of gene expression in cultured adipocytes was performed with QuantiGene 2.0 Plex Assay kit (Affymetrix) according to manufacturer instructions. Plates were analyzed in the Bio-Plex Luminex 200 system (BioRad, Hercules, CA; USA), gene expression was calculated using Bio-Plex Manager 5.0 software, and results were normalized to 18S expression. Concentrations of secreted factors were assessed in non-immune cell culture media by the Luminex technology (Millipore, Billerica, MA, USA) or by ELISA (Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA) in CD45<sup>+</sup> cell conditioned medium.

#### Statistical analyses

All data are shown as mean  $\pm$  SEM. Differences between two groups were performed using the nonparametric paired Wilcoxon or unpaired Mann-Whitney comparative tests. For all analyses, a *P* value < 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were done with GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad Software).

## RESULTS

### *Expression of immune cell-derived cytokines and their cognate receptors in adipose tissue cell types*

The cellular sources of IL-1 $\beta$  and Th17 related-cytokines were explored in adipocytes and cells of the stroma vascular fraction (SVF) isolated from omental adipose tissue of obese subjects. IL-17 and IL-22 were both exclusively expressed in the CD45<sup>+</sup> immune cells of the SVF (**Figure 1a, b**). Pro-IL-1 $\beta$  gene expression was detected in immune cells and, at lower levels, in SVF CD45<sup>-</sup> cells and in adipocytes (**Figure 1c**). Within adipose tissue immune cell fraction, Th17 cytokines were expressed in CD4<sup>+</sup> T cells, while the CD14<sup>+</sup> cell-enriched fraction was the main site of pro-IL-1 $\beta$  gene expression. Collectively, these data confirm that immune cells are the major source of cytokines in human adipose tissue.

As a prerequisite for investigation of the effects of IL-1 $\beta$  and Th17 cytokines, we explored the cell distribution of their cognate receptors. IL-17RA and IL-1R1 mRNA were detected in CD45<sup>+</sup> and CD45<sup>-</sup> cells and in adipocytes, with a markedly prominent expression of IL-17RA in CD45<sup>+</sup> immune cells (**Figure 1d**). A distinct distribution was found for IL-22RA1, expressed mostly, if not exclusively, in non-adipocyte CD45<sup>-</sup> cells. These data indicate that non-immune cells of human adipose tissue are potential target for both IL-1 $\beta$  and Th17 cytokines. Here, we explored this question in three human cell types, including pre-adipocytes, CD31<sup>+</sup> endothelial and adipocytes, which were cultured for various periods of time. By the end of the culture periods, IL-1R1 and IL-17RA mRNA were readily expressed in the three cell types (**Figure 1e**). By contrast, IL-22RA1 mRNA was not detected, precluding further *in vitro* exploration of the impact of IL-22 in these human cell models.

### *Induction of a pro-inflammatory signature in human adipose tissue non-immune cells*

To assess and compare the effects of IL-17 and IL-1 $\beta$ , pre-adipocytes were screened by PCR array for change in the expression of 84 genes related to inflammation and extracellular matrix remodeling in response to recombinant human cytokines (rIL-1 $\beta$ , rIL-17). This analysis revealed that both rIL-1 $\beta$  and rIL-17 induced an inflammatory signature, but of different nature (**Table 1**). Indeed, 41 genes were induced by rIL-1 $\beta$  *versus* only 8 by rIL-17, according to a 2-fold induction threshold. Moreover, the fold stimulatory effect of rIL-1 $\beta$  was markedly higher than that of rIL-17 on the same genes. Thus, rIL-1 $\beta$  induced qualitatively distinct and quantitatively more pronounced responses than rIL-17 in human pre-adipocytes. Matrix modifying enzymes MMP-1 and MMP-3, the chemokine CCL2 and pro-IL-1 $\beta$  were among the genes most up-regulated by the two cytokines.

This initial screen in pre-adipocytes prompted a search for cytokine-induced inflammatory alterations in other adipose tissue non-immune cells. To this aim, we focused on a set of inflammation-related genes, including chemokines (CCL2, IL-8, CCL20) and cytokines (pro-IL-1 $\beta$  and IL-6) known to be altered in the adipose tissue of obese subjects. Confirming and extending previous data, all five genes were up-regulated in response to rIL-1 $\beta$  in pre-adipocytes, CD31<sup>+</sup> endothelial cells and primary adipocytes. A stimulatory effect of rIL-17, although significant on most genes, was markedly weaker

(**Figure 2a-c**). In presence of both cytokines combined, the inflammatory response was of similar amplitude as that induced by IL-1 $\beta$  alone (data not shown).

To substantiate the effects of IL-1 $\beta$  and IL-17 in the context of adipose tissue microenvironment, cells were cultured with CD45<sup>+</sup> cell conditioned medium (CD45<sup>+</sup> CM). Several factors were quantified in this medium, including IL-1 $\beta$  (153 pg/mL), IL-17 (102 pg/mL), IL-22 (134 pg/mL), TNF- $\alpha$  (138 pg/mL) and much larger concentrations of IL-6 (853 pg/mL). CD45<sup>+</sup> CM up-regulated inflammatory gene expression in the three cell types with distinct amounts of stimulation (**Figure 2d-f**). CD45<sup>+</sup> CM fold inductions were lower than that elicited by rIL-1 $\beta$  in pre-adipocytes and CD31<sup>+</sup> cells. In these cell types, weak inhibitory effects were observed in presence of anti-IL-1 $\beta$  and anti-IL-17 neutralizing antibodies (**Figure 2d,e**). In adipocytes, however, CD45<sup>+</sup> CM exerted a strong pro-inflammatory effect of similar magnitude as that induced by rIL-1 $\beta$ . Importantly, the CD45<sup>+</sup> CM stimulatory effects on inflammatory genes were efficiently dampened upon IL-1 $\beta$  and IL-17 neutralization (**Figure 2f**).

We next measured the release of a series of inflammation-related factors in cell culture media. CD31<sup>+</sup> cells and adipocytes produced significant amounts of several chemokines (CCL20, CXCL1, IL-8, CCL2), cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) and other factors (VEGF $\alpha$ , G-CSF, PAI-1). The secretory capacity of pre-adipocytes was weaker, as suggested by lower or undetectable amounts of these factors (**Figure 3a-c**). rIL-1 $\beta$  and rIL-17 to a lesser extent increased the release of virtually all factors (**Figure 3d-f**). No further effect over IL-1 $\beta$ -induced stimulation was detected in response to the two cytokines combined (data not shown). Interestingly, low amounts of IL-1 $\beta$  were secreted by the three cell types and significantly increased in response to rIL-17 (**Figure 3g**).

#### *Low impact on extracellular matrix and fibrotic gene expression*

Since adipose tissue inflammation is associated with fibrosis accumulation in human obesity, we next explored whether IL-1 $\beta$  and IL-17 might contribute to fibrotic alterations, focusing on the response of pre-adipocytes (**Figure 4a-c**) and CD31<sup>+</sup> endothelial cells (**Figure 4d-f**). Based on previous data from our team showing that these cells were responsive to TGF- $\beta$ 1, we used this master regulator of fibrogenesis as a positive control in this set of experiments. Gene- and cell-specific responses to recombinant TGF- $\beta$ 1 (rTGF- $\beta$ 1) were found. Collagen types IV (COL4A1) and fibronectin (FN1) were up-regulated in both cell types, with a more pronounced effect in CD31<sup>+</sup> cells than in pre-adipocytes, while collagen types I and III (COL3A1, COL1A1) were induced only in CD31<sup>+</sup> cells. Pro-fibrotic activation was substantiated by induction of a collagen cross-linking enzyme (LOX) and fibrogenic factors (CTGF, PAI-1), which were all induced. Notably, rTGF- $\beta$ 1 enhanced its own gene expression, indicating self-amplification of its pro-fibrotic effect. Compared to rTGF- $\beta$ 1, the effects of rIL-17 and rIL-1 $\beta$  on this set of fibrotic genes were less pronounced or even absent. Only PAI-1 gene expression was up-regulated in a concordant manner by the three factors in both cell types. A notable exception is a striking up-regulation of MMP-1 and MMP-3 by rIL-1 $\beta$ , confirming and extending PCR

array data (**Table 1**). CD45<sup>+</sup> CM reproduced this effect, which was partly inhibited by anti-IL-1 $\beta$  and anti-IL-17 neutralizing antibodies.

*Down-regulation of metabolic genes in primary human adipocytes*

The impact of rIL-1 $\beta$  and rIL-17 on metabolic genes was investigated in human adipocytes cultured in Puramatrix hydrogel, a condition where metabolic capacity was maintained over prolonged period of culture. We found that both rIL-1 $\beta$  and rIL-17 exerted catabolic effects, witnessed by down regulation of a series of metabolic genes (**Figure 5a**). This includes genes functionally related to *de novo* lipogenesis (ACC, FAS, PPARG), fatty acid binding and transport (LPL, CD36, FABP4) and lipolysis (PLIN1, ATGL, FSP27, AdPLA, LIPA). Other genes such as the glucose transporter GLUT1 were not affected. In cell cultured implemented with CD45<sup>+</sup> CM, the amplitude of metabolic gene down regulation was in the same range as that produced by recombinant cytokines. Neutralization of IL-1 $\beta$  and IL17 attenuated but did not fully block the catabolic effects of CD45<sup>+</sup> CM (**Figure 5b**). Interestingly, the amounts of down regulation of CD36 and FABP4 genes were inversely correlated with the magnitude of inflammatory gene response in adipocytes (**Figure 5c,d**).



## DISCUSSION

Adipose tissue is composed of a variety of structural, metabolic and immune cells, which communicate through a network of mediators. In obesity, accumulation of immune cells in the adipose tissue compromises local cytokine production, with deleterious consequences on adipose tissue biology. The complex crosstalks implicated, potentially involving a number of paracrine factors and cell types, are not precisely understood, especially in the human adipose tissue.

Among a myriad of factors, we previously identified macrophage-derived IL-1 $\beta$  and Th17 cytokines as major contributors of a chronic inflammatory state in the adipose tissue of obese subjects.<sup>29</sup> Here, we extended the deleterious implication of these cytokines by showing that they induce pro-inflammatory and catabolic responses in adipose tissue non-immune cells. Although IL-17 contributes to these cellular alterations, our data enlighten a markedly more potent effect of IL-1 $\beta$ , adding further support for its role of “master” regulator of adipose tissue dysfunctional state in human obesity.

Whereas fundamental insights in adipose tissue immunity and its deterioration in obesity have emerged from studying animal models, adipose immune cell profile and cell-cell interactions might be critically different between mice and humans. We previously showed<sup>29</sup> and confirmed here that CD4<sup>+</sup> T cells are the main IL-17 and IL-22 producing cells in human adipose tissue. In mice, IL-17 was shown to be produced by different cell types mostly CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>  $\gamma/\delta$  T cells.<sup>32</sup> A few mouse studies have explored the pathogenicity of Th17 cytokines in the context of metabolic alterations. In one study, phenotypic exploration of mice lacking IL-17 did not demonstrate a protective effect against diet-induced obesity and insulin resistance.<sup>32</sup> In other studies, pharmacological administration of IL-22 to genetically and diet induced obese mice improved insulin sensitivity,<sup>36</sup> while IL-22 overexpression in adipocytes did not alter metabolic phenotype.<sup>37</sup>

These limited observations suggest that Th17 cytokines might be more pathologically relevant in human than in mouse adipose tissue. Thus, to address a potential deleterious implication of Th17 cytokines, we used relevant primary cells derived from human adipose tissue, which have been extensively explored in our team in the context adipose tissue inflammation.<sup>11,12,34,35,38</sup> As previously reported in cultured human keratinocytes<sup>39</sup>, IL-22RA1 was suppressed in these cell models. By contrast, all three cell types, including pre-adipocytes, adipocytes and CD31<sup>+</sup> endothelial cells expressed the signaling receptor of IL-17, allowing identification of a direct stimulatory effect of the cytokine on inflammation related factors.

Our results reveal the existence of complex relationships between immune and non-immune cell compartments within the human adipose tissue. In response to immune cell-derived cytokines, pre-adipocytes, endothelial cells and mature adipocytes undergo marked inflammatory activation, promoting enhanced production of chemokines known to attract and maintain immune cells within adipose tissue. As such, non-immune cells are likely to amplify the signals required for recruitment of monocyte precursors of macrophages (CCL2), neutrophils (IL-8) or T cells (CCL20). Our data

indicate that IL-1 $\beta$  and IL-17 are important actors of this vicious circle. The potent inhibition CD45<sup>+</sup> CM-induced pro-inflammatory effect upon IL-1 $\beta$  and IL-17 neutralization suggests that adipocytes are major targets of both cytokines. The effects of CD45<sup>+</sup> CM, as well as antibodies-mediated inhibition, were less marked in pre-adipocytes and endothelial cells than in adipocytes, indicating that non-immune cells might contribute differentially to inflammation in the context of obese adipose tissue microenvironment.

Pro-IL-1 $\beta$  was one of the most up-regulated genes by IL-1 $\beta$  it-self, in line with the well established self-amplification of this cytokine.<sup>40,41</sup> Interestingly, IL-17 increased by more than two fold the release of mature IL-1 $\beta$  by the non-immune cells explored in the present study. This extends the cellular targets of the deleterious paracrine dialogue mediated by these cytokines within human adipose tissue. Further studies are now needed to substantiate the molecular mechanisms, by which IL-17 activates the NLRP3/caspase1 dependent pathways driving pro-IL-1 $\beta$  maturation and release.<sup>42,43</sup> Of note, IL-17 enhanced NLRP3-dependent IL-1 $\beta$  release by human keratinocytes<sup>44</sup>, suggesting that the cytokine has the capacity to promote IL-1 $\beta$  release in non-immune cells.

In obesity, chronic inflammation associates accumulation of several fibrosis components in the adipose tissue. Our team has highlighted the presence of collagen types I and III in fibrotic areas and stressed the leading roles of pre-adipocytes and endothelial cells in human adipose tissue fibrogenesis.<sup>12,45</sup> Recently, we proposed the contribution of basement membrane components such as collagen IV in adipose tissue fibrosis.<sup>38</sup> This prompted us to ask whether IL-1 $\beta$  and Th17 cytokines were only pro-inflammatory or also profibrotic. In line with previous observations<sup>12,38,46</sup>, pre-adipocytes and CD31<sup>+</sup> endothelial cells displayed fibrotic activation in response to rTGF- $\beta$ 1. By contrast, rIL-17 and rIL-1 $\beta$  did not demonstrate a significant pro-fibrogenic effect. This was supported by the failure of CD45<sup>+</sup> CM to induce a fibrotic signature. Since these cytokines have been implicated in mediating experimental pulmonary fibrosis in mice<sup>47,48</sup>, their fibrogenic potential might be cell-specific and/or dependent on tissue local inflammatory milieu.

rIL-1 $\beta$  markedly enhanced MMPs gene expression in both pre-adipocytes and CD31<sup>+</sup> cells, an effect, which was reproduced by CD45<sup>+</sup> CM. In line with our current data, IL-1 $\beta$  was previously shown to contribute to macrophage-induced expression and release of MMP-1 and MMP-3 in human pre-adipocytes.<sup>49</sup> Although the role of MMPs remain to be fully deciphered, their extracellular matrix remodeling function could favor immune cell infiltration, thereby contributing indirectly to pro-inflammatory effects of IL-1 $\beta$  in human adipose tissue.

Within the adipose tissue, adipocytes are exposed to the effect of numerous factors, including cytokines, metabolites, hormones and even pollutants, which affect their metabolic capacity and cellular functions. Here, we enlighten a role for IL-1 $\beta$  and IL-17 to induce a catabolic state in these cells, as suggested by coincident down regulation of genes involved in both lipogenic and lipolytic pathways. CD45<sup>+</sup> CM induced roughly similar metabolic deregulation as IL-1 $\beta$ , but this effect was only partly blocked by IL-1 $\beta$  and IL-17 neutralization. IL-6 and/or TNF- $\alpha$  are likely candidates to

contribute to CD45<sup>+</sup> CM effects for their well established effect to promote inflammation and insulin resistance in adipocytes and at systemic level.<sup>15</sup> Whether the effects of IL-17 and IL-1 $\beta$  to down regulate metabolic genes in adipocytes are direct or secondary to increased release of IL-6 and/or TNF- $\alpha$  remains to be determined. The inverse relationship found between metabolic and inflammatory gene expression strengthens the negative impact of inflammation on adipocyte metabolism and particularly accurate on storage capacity. Our data suggest that the fatty acid binding proteins, CD36 and FABP4, are prominently altered. Given their implication in fatty acid uptake and intracellular transport,<sup>50,51</sup> reduced levels of CD36 and FABP4 gene expression could contribute to alter proper lipid storage in adipocytes.

In conclusion, this study extends the pathological relevance of IL-1 $\beta$  and IL-17 to non-immune cells in human adipose tissue. Coupled with our previous data, we propose a scenario, in which the pathogenicity of IL-1 $\beta$  and Th17 cytokines relies on amplification of their release through macrophage-T cell interactions associated with their potent capacity to induce pro-inflammatory and catabolic responses in adipose tissue non-immune cells, including adipocytes. We cannot exclude the implication of several pro-inflammatory mediators in the complex interplay between immune and non-immune cells driving obesity-induced cellular alterations in adipose tissue. Nevertheless, the prominent effect of IL-1 $\beta$  demonstrated in the present study provides additional rationale for future anti-IL-1 $\beta$  immunotherapy to tame adipose tissue metabolic deterioration in human obesity.

## **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare no conflict of interest.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors are grateful to previous member of the team, Elise Dalmas, Danièle Lacasa and Vanessa Pellegrinelli, for useful discussion. CC was the recipient of grants from French Ministère de la Recherche and from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM: FDT20150532008). Funding was obtained from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM DEQ20120323701), the National Agency of Research (ANR, Adipofib) and Fondation de France. The clinical work was supported by clinical research contract (Fibrota NCT01655017 to J A-W). We thank clinical research assistant Valentine Lemoine and Dr Florence Marchelli for patient recruitment and data management.

## REFERENCES

1. Morris DL, Singer K, Lumeng CN. Adipose tissue macrophages: phenotypic plasticity and diversity in lean and obese states. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2011; **14**: 341-346.
2. Chawla A, Nguyen KD, Goh YP. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 2011; **11**: 738-749.
3. Dalmas E, Clement K, Guerre-Millo M. Defining macrophage phenotype and function in adipose tissue. *Trends Immunol* 2011; **32**: 307-314.
4. Kratz M, Coats BR, Hisert KB, Hagman D, Mutskov V, Peris E, *et al.* Metabolic dysfunction drives a mechanistically distinct proinflammatory phenotype in adipose tissue macrophages. *Cell Metab* 2014; **20**: 614-625.
5. Boutens L, Stienstra R. Adipose tissue macrophages: going off track during obesity. *Diabetologia* 2016; **59**: 879-894.
6. DiSpirito JR, Mathis D. Immunological contributions to adipose tissue homeostasis. *Semin Immunol* 2015; **27**: 315-321.
7. Magalhaes I, Pingris K, Poitou C, Bessoles S, Venteclef N, Kiaf B, *et al.* Mucosal-associated invariant T cell alterations in obese and type 2 diabetic patients. *J Clin Invest* 2015; **125**: 1752-1762.
8. Suganami T, Nishida J, Ogawa Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; **25**: 2062-2068.
9. Permana PA, Menge C, Reaven PD. Macrophage-secreted factors induce adipocyte inflammation and insulin resistance. *Biochem.Biophys.Res Commun.* 2006; .
10. Lumeng CN, Deyoung SM, Saltiel AR. Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; **292**: E166-174.
11. Lacasa D, Taleb S, Keophiphath M, Miranville A, Clement K. Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of proinflammatory state in preadipocytes. *Endocrinology* 2007; **148**: 868-877.
12. Keophiphath M, Achard V, Henegar C, Rouault C, Clement K, Lacasa D. Macrophage-secreted factors promote a profibrotic phenotype in human preadipocytes. *Mol Endocrinol* 2009; **23**: 11-24.
13. Gao D, Madi M, Ding C, Fok M, Steele T, Ford C, *et al.* Interleukin-1beta mediates macrophage-induced impairment of insulin signaling in human primary adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014; **307**: E289-304.
14. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; **259**: 87-91.
15. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006; **444**: 860-867.

16. Osborn O, Brownell SE, Sanchez-Alavez M, Salomon D, Gram H, Bartfai T. Treatment with an Interleukin 1 beta antibody improves glycemic control in diet-induced obesity. *Cytokine* 2008; **44**: 141-148.
17. McGillicuddy FC, Harford KA, Reynolds CM, Oliver E, Claessens M, Mills KH, *et al.* Lack of interleukin-1 receptor I (IL-1RI) protects mice from high-fat diet-induced adipose tissue inflammation coincident with improved glucose homeostasis. *Diabetes* 2011; **60**: 1688-1698.
18. Cavelti-Weder C, Babians-Brunner A, Keller C, Stahel MA, Kurz-Levin M, Zayed H, *et al.* Effects of gevokizumab on glycemia and inflammatory markers in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2012; **35**: 1654-1662.
19. Lagathu C, Bastard JP, Auclair M, Maachi M, Capeau J, Caron M. Chronic interleukin-6 (IL-6) treatment increased IL-6 secretion and induced insulin resistance in adipocyte: prevention by rosiglitazone. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **311**: 372-379.
20. Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem* 2003; **278**: 45777-45784.
21. Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Blondy P, Capeau J, Laville M, *et al.* Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; **85**: 3338-3342.
22. Bastard JP, Maachi M, Van Nhieu JT, Jardel C, Bruckert E, Grimaldi A, *et al.* Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; **87**: 2084-2089.
23. Patton JS, Shepard HM, Wilking H, Lewis G, Aggarwal BB, Eessalu TE, *et al.* Interferons and tumor necrosis factors have similar catabolic effects on 3T3 L1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; **83**: 8313-8317.
24. Khazen W, Distel E, Collinet M, Chaves VE, M'Bika JP, Chany C, *et al.* Acute and selective inhibition of adipocyte glyceroneogenesis and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase by interferon gamma. *Endocrinology* 2007; **148**: 4007-4014.
25. Duffaut C, Zakaroff-Girard A, Bourlier V, Decaunes P, Maumus M, Chiotasso P, *et al.* Interplay between human adipocytes and T lymphocytes in obesity: CCL20 as an adipochemokine and T lymphocytes as lipogenic modulators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; **29**: 1608-1614.
26. McGillicuddy FC, Chiquoine EH, Hinkle CC, Kim RJ, Shah R, Roche HM, *et al.* Interferon gamma attenuates insulin signaling, lipid storage, and differentiation in human adipocytes via activation of the JAK/STAT pathway. *J Biol Chem* 2009; **284**: 31936-31944.
27. Bertola A, Ciucci T, Rousseau D, Bourlier V, Duffaut C, Bonnafous S, *et al.* Identification of adipose tissue dendritic cells correlated with obesity-associated insulin-resistance and inducing Th17 responses in mice and patients. *Diabetes* 2012; **61**: 2238-2247.

28. Fabbrini E, Cella M, McCartney SA, Fuchs A, Abumrad NA, Pietka TA, *et al.* Association Between Specific Adipose Tissue CD4(+) T-Cell Populations and Insulin Resistance in Obese Individuals. *Gastroenterology* 2013; **145**: 366-374 e363.
29. Dalmas E, Venteclef N, Caer C, Poitou C, Cremer I, Aron-Wisnewsky J, *et al.* T cell-derived IL-22 amplifies IL-1beta-driven inflammation in human adipose tissue: relevance to obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* 2014; **63**: 1966-1977.
30. Lagathu C, Yvan-Charvet L, Bastard JP, Maachi M, Quignard-Boulange A, Capeau J, *et al.* Long-term treatment with interleukin-1beta induces insulin resistance in murine and human adipocytes. *Diabetologia* 2006; **49**: 2162-2173.
31. Jager J, Gremeaux T, Cormont M, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. Interleukin-1beta-induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology* 2007; **148**: 241-251.
32. Zuniga LA, Shen WJ, Joyce-Shaikh B, Pyatnova EA, Richards AG, Thom C, *et al.* IL-17 regulates adipogenesis, glucose homeostasis, and obesity. *J Immunol* 2010; **185**: 6947-6959.
33. Ahmed M, Gaffen SL. IL-17 inhibits adipogenesis in part via C/EBPalpha, PPARGgamma and Kruppel-like factors. *Cytokine* 2013; **61**: 898-905.
34. Rouault C, Pellegrinelli V, Schilch R, Cotillard A, Poitou C, Tordjman J, *et al.* Roles of chemokine ligand-2 (CXCL2) and neutrophils in influencing endothelial cell function and inflammation of human adipose tissue. *Endocrinology* 2013; **154**: 1069-1079.
35. Pellegrinelli V, Rouault C, Veyrie N, Clement K, Lacasa D. Endothelial cells from visceral adipose tissue disrupt adipocyte functions in a three-dimensional setting: partial rescue by angiopoietin-1. *Diabetes* 2014; **63**: 535-549.
36. Wang X, Ota N, Manzanillo P, Kates L, Zavala-Solorio J, Eidenschenk C, *et al.* Interleukin-22 alleviates metabolic disorders and restores mucosal immunity in diabetes. *Nature* 2014; **514**: 237-241.
37. Wang Z, Yang L, Jiang Y, Ling ZQ, Li Z, Cheng Y, *et al.* High fat diet induces formation of spontaneous liposarcoma in mouse adipose tissue with overexpression of interleukin 22. *PLoS One* 2011; **6**: e23737.
38. Reggio S, Rouault C, Poitou C, Bichet JC, Prifti E, Bouillot JL, *et al.* Increased basement membrane components in adipose tissue during obesity: links with TGFbeta and metabolic phenotypes. *J Clin Endocrinol Metab* 2016: jc20154304.
39. Tohyama M, Hanakawa Y, Shirakata Y, Dai X, Yang L, Hirakawa S, *et al.* IL-17 and IL-22 mediate IL-20 subfamily cytokine production in cultured keratinocytes via increased IL-22 receptor expression. *Eur J Immunol* 2009; **39**: 2779-2788.
40. Dinarello CA, Marnoy SO, Rosenwasser LJ. Role of arachidonate metabolism in the immunoregulatory function of human leukocytic pyrogen/lymphocyte-activating factor/interleukin 1. *J Immunol* 1983; **130**: 890-895.

41. Weber A, Wasiliew P, Kracht M. Interleukin-1beta (IL-1beta) processing pathway. *Sci Signal* 2010; **3**: cm2.
42. Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* 2014; **157**: 1013-1022.
43. Guo H, Callaway JB, Ting JP. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med* 2015; **21**: 677-687.
44. Cho KA, Suh JW, Lee KH, Kang JL, Woo SY. IL-17 and IL-22 enhance skin inflammation by stimulating the secretion of IL-1beta by keratinocytes via the ROS-NLRP3-caspase-1 pathway. *Int Immunol* 2012; **24**: 147-158.
45. Divoux A, Tordjman J, Lacasa D, Veyrie N, Hugol D, Aissat A, *et al.* Fibrosis in human adipose tissue: composition, distribution, and link with lipid metabolism and fat mass loss. *Diabetes* 2010; **59**: 2817-2825.
46. Bourlier V, Sengenès C, Zakaroff-Girard A, Decaunes P, Wdziekonski B, Galitzky J, *et al.* TGFbeta family members are key mediators in the induction of myofibroblast phenotype of human adipose tissue progenitor cells by macrophages. *PLoS One* 2012; **7**: e31274.
47. Wilson MS, Madala SK, Ramalingam TR, Gochuico BR, Rosas IO, Cheever AW, *et al.* Bleomycin and IL-1beta-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. *J Exp Med* 2010; **207**: 535-552.
48. Mi S, Li Z, Yang HZ, Liu H, Wang JP, Ma YG, *et al.* Blocking IL-17A promotes the resolution of pulmonary inflammation and fibrosis via TGF-beta1-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol* 2011; **187**: 3003-3014.
49. Gao D, Bing C. Macrophage-induced expression and release of matrix metalloproteinase 1 and 3 by human preadipocytes is mediated by IL-1beta via activation of MAPK signaling. *J Cell Physiol* 2011; **226**: 2869-2880.
50. Hajri T, Abumrad NA. Fatty acid transport across membranes: relevance to nutrition and metabolic pathology. *Annu Rev Nutr* 2002; **22**: 383-415.
51. Furuhashi M, Hotamisligil GS. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 2008; **7**: 489-503.

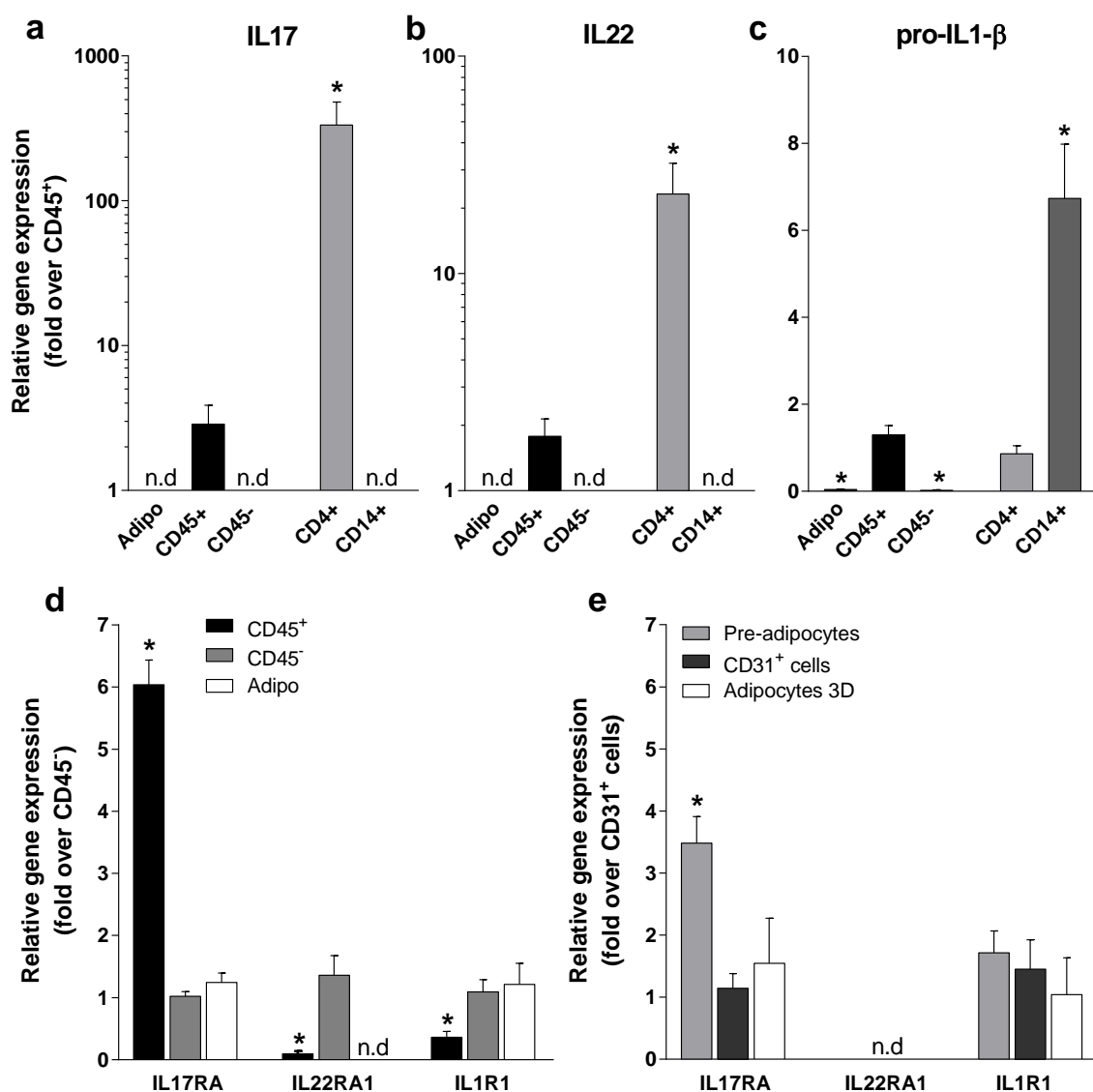


**TABLE**

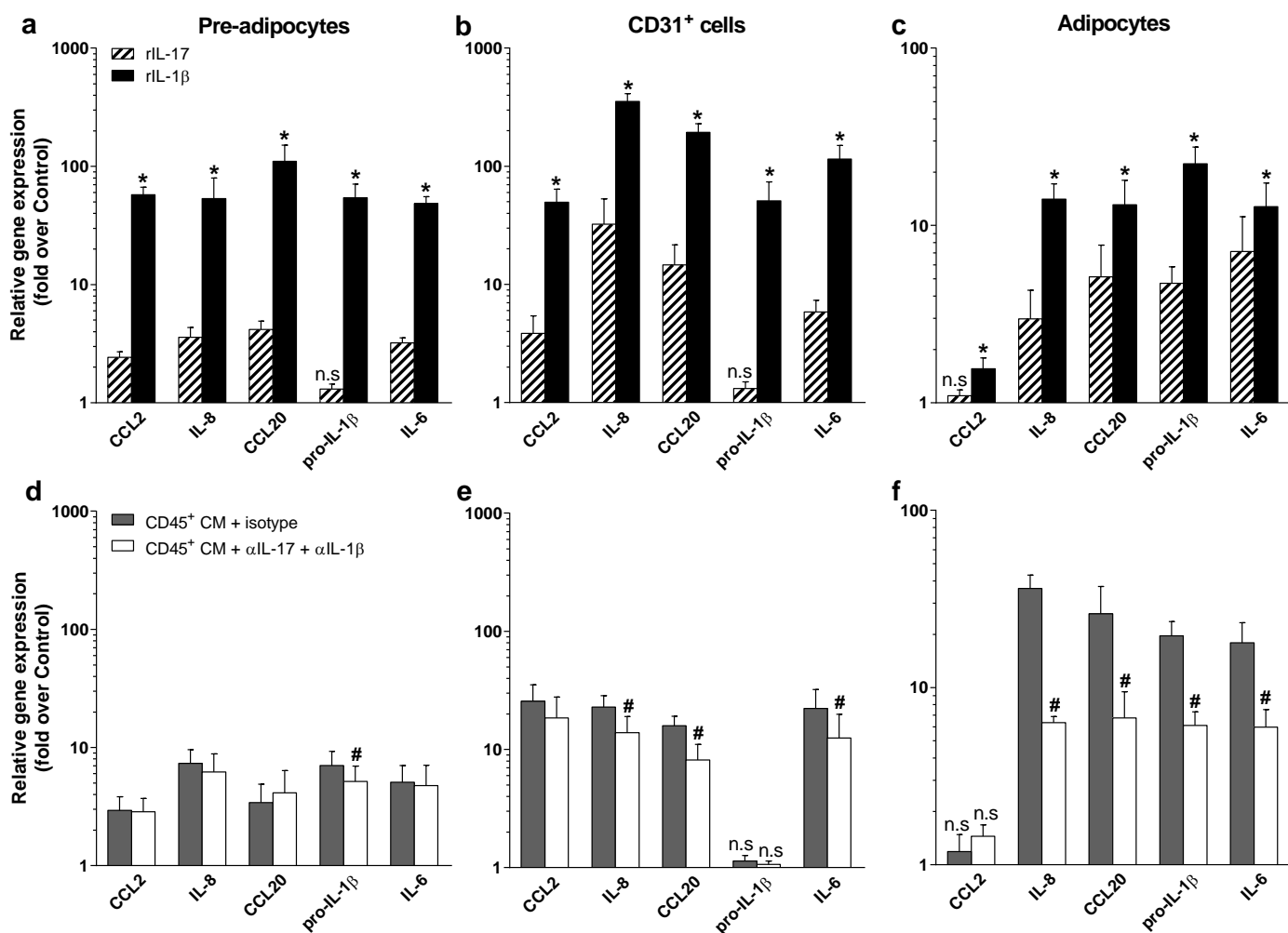
<b>Table 1.</b>	PCR array analysis of 84 genes related to inflammation and fibrosis in primary human pre-adipocytes.			
Symbol	Refseq	Description	IL-1 $\beta$	IL-17
<b>MMP1</b>	<b>NM_002421</b>	<b>Matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)</b>	<b>924.2</b>	<b>4.8</b>
<b>MMP3</b>	<b>NM_002422</b>	<b>Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)</b>	<b>882.8</b>	<b>2.7</b>
<b>IL1B</b>	<b>NM_000576</b>	<b>Interleukin 1, beta</b>	<b>412.7</b>	<b>6.9</b>
<b>CCL2</b>	<b>NM_002982</b>	<b>Chemokine (C-C motif) ligand 2</b>	<b>137.8</b>	<b>6.1</b>
<b>MMP8</b>	<b>NM_002424</b>	<b>Matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase)</b>	<b>98.8</b>	<b>6.4</b>
CCL3	NM_002983	Chemokine (C-C motif) ligand 3	48.2	-1.2
CXCR4	NM_003467	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	42.1	-2.7
ITGA2	NM_002203	Integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)	35.1	-1.9
IL1A	NM_000575	Interleukin 1, alpha	26.1	-1.1
<b>CEBPB</b>	<b>NM_005194</b>	<b>CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta</b>	<b>24.9</b>	<b>2.3</b>
SERPINA1	NM_000295	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin, antitrypsin), member 1	16.3	1.9
<b>SERPINE1</b>	<b>NM_000602</b>	<b>Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1</b>	<b>11.5</b>	<b>2.8</b>
MMP14	NM_004995	Matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)	6.5	1.9
LTBP1	NM_000627	Latent transforming growth factor beta binding protein 1	6.4	-1.3
JUN	NM_002228	Jun proto-oncogene	5.7	1.5
TNF	NM_000594	Tumor necrosis factor	5.4	-3.9
MMP9	NM_004994	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)	4.7	-1.1
<b>GREM1</b>	<b>NM_013372</b>	<b>Gremlin 1</b>	<b>4.7</b>	<b>2.7</b>
TGFB1	NM_004612	Transforming growth factor, beta receptor 1	4.1	1.1
ITGA3	NM_002204	Integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)	4.0	-1.2
TGFB2	NM_003238	Transforming growth factor, beta 2	3.7	1.3
TGIF1	NM_003244	TGFB-induced factor homeobox 1	3.6	1.1
NFKB1	NM_003998	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	3.6	1.1
SMAD7	NM_005904	SMAD family member 7	3.5	-2.0
IL13RA2	NM_000640	Interleukin 13 receptor, alpha 2	3.5	-1.1
ITGB1	NM_002211	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	3.5	-1.0
PLAU	NM_002658	Plasminogen activator, urokinase	3.4	1.1
ITGA1	NM_181501	Integrin, alpha 1	3.4	-1.1
COL3A1	NM_000090	Collagen, type III, alpha 1	3.4	1.5
TGFB1	NM_000660	Transforming growth factor, beta 1	3.3	1.9
TIMP1	NM_003254	TIMP metalloproteinase inhibitor 1	3.1	-1.6
VEGFA	NM_003376	Vascular endothelial growth factor A	3.0	-1.9
THBS1	NM_003246	Thrombospondin 1	2.9	1.5
THBS2	NM_003247	Thrombospondin 2	2.8	-1.0
TIMP4	NM_003256	TIMP metalloproteinase inhibitor 4	2.7	1.1
STAT1	NM_007315	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	2.5	1.3
SMAD3	NM_005902	SMAD family member 3	2.3	1.0
MMP2	NM_004530	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)	2.2	1.1
MYC	NM_002467	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	2.1	-1.5
PDGFA	NM_002607	Platelet-derived growth factor alpha polypeptide	2.1	-1.1
HGF	NM_000601	Hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)	2.0	-3.6

Cells were treated or not by recombinant rIL-1 $\beta$  (10 ng/mL) or rIL-17 (10 ng/mL). The data show the fold changes over untreated control cells for 41 genes up-regulated by rIL-1 $\beta$  with a 2-fold threshold. Bold labeling identifies 8 genes up-regulated by rIL-17 in the same culture.

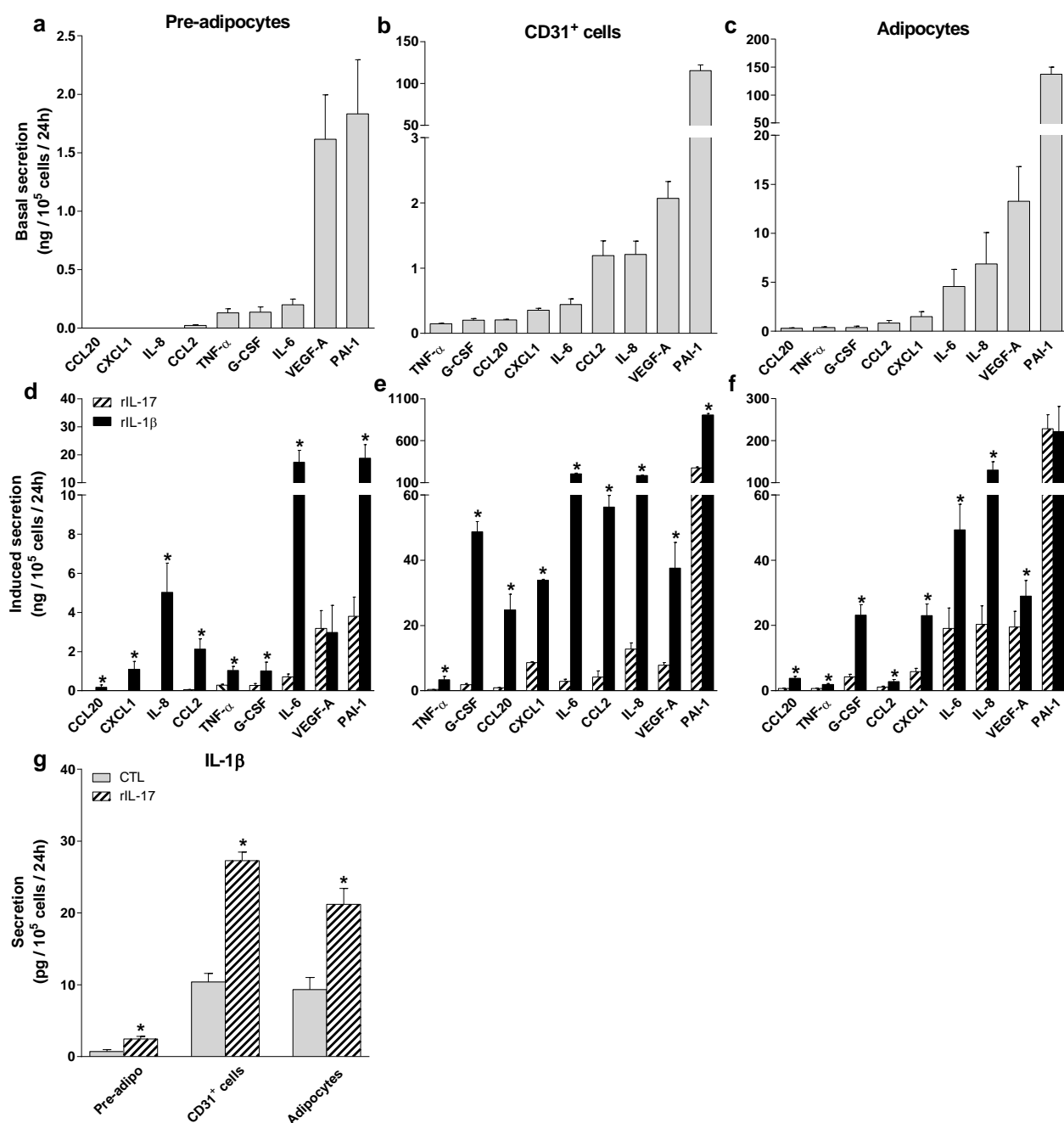
## FIGURES



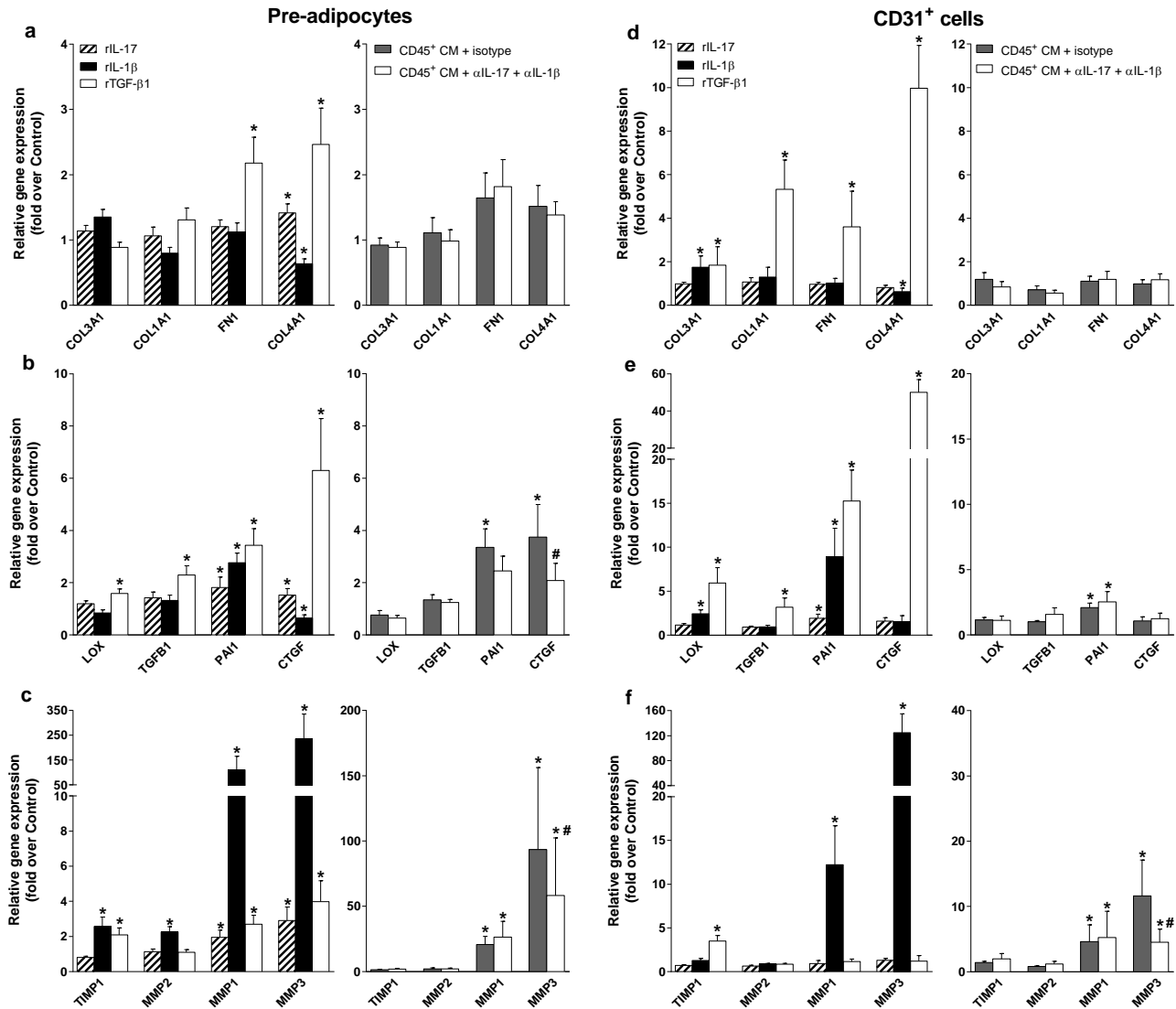
**Figure 1.** Expression of IL-17, IL-22, IL-1 $\beta$  and their cognate receptors in human adipose tissue immune and non immune cells. (a-c) *IL17*, *IL22* and pro-*IL-1 $\beta$*  mRNA levels were determined by RT-qPCR in adipocytes, CD45<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD14<sup>+</sup> cells freshly isolated from omental adipose tissue of obese subjects (n = 10). \**P* < 0.05 versus CD45<sup>+</sup> cells. (d) *IL17RA*, *IL22RA1* and *IL1R1* mRNA were determined in adipocytes, CD45<sup>+</sup> and CD45<sup>-</sup> cells freshly isolated from omental adipose tissue of obese subjects (n = 10). \**P* < 0.05 versus CD45<sup>-</sup> cells. (e) *IL17RA*, *IL22RA1* and *IL1R1* mRNA were determined in pre-adipocytes (n = 7), CD31<sup>+</sup> endothelial cells (n = 6) and adipocytes 3D (n = 4) obtained from lipoaspirate adipose tissue samples. \**P* < 0.05 versus CD31<sup>+</sup> cells. Data are shown as mean  $\pm$  SEM. n.d: not determined.



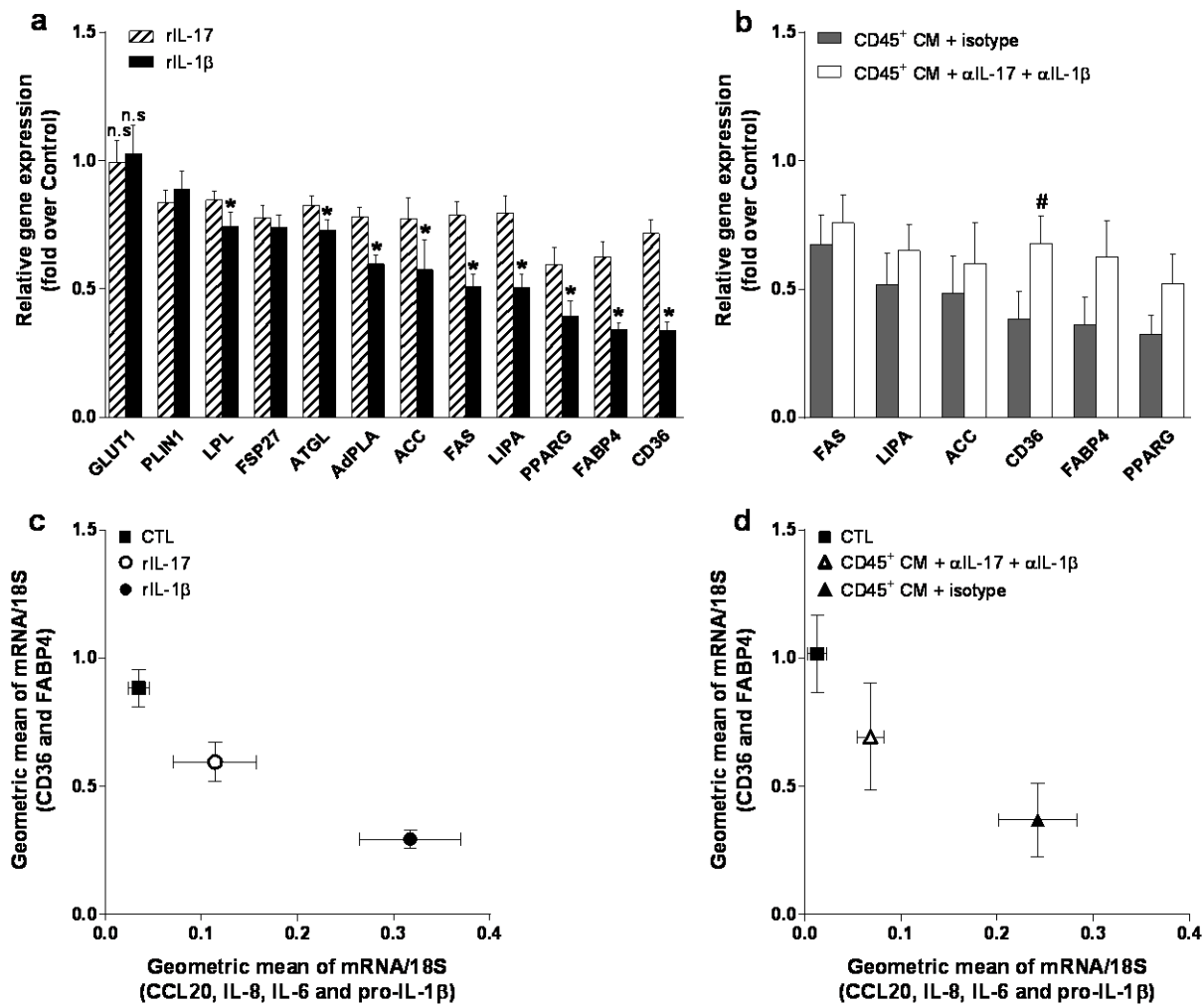
**Figure 2.** Induction of a pro-inflammatory signature in human adipose tissue non-immune cells. (a-c) CCL2, IL-8, CCL20, pro-IL-1β and IL-6 mRNA were determined by RT-qPCR in pre-adipocytes (n = 10) and CD31<sup>+</sup> endothelial cells (n = 6) cultured for 96 h and by QuantiGene Plex in adipocytes 3D cultured for 72 h (n = 10) without or with rIL-17 (10 ng/mL) or rIL-1β (10 ng/mL). **Fold inductions were statistically significant for all genes, except when indicated (n.s).** \*P < 0.05 versus cells treated by rIL-17. (d-f) CCL2, IL-8, CCL20, pro-IL-1β and IL-6 gene expression in pre-adipocytes (n = 6), CD31<sup>+</sup> endothelial cells (n = 6) and adipocytes 3D (n = 6) treated or not with CD45<sup>+</sup> cells conditioned medium (CD45<sup>+</sup> CM) in presence of isotype or anti-IL-1β (αIL-1β) and anti-IL17 (αIL-17) neutralizing antibodies. Fold inductions over basal were statistically significant (P < 0.05) for all genes, except when indicated (n.s). #P < 0.05 versus cells treated by CD45<sup>+</sup> cells CM + isotype. Data are shown as mean ± SEM. n.s: not significant.



**Figure 3.** Release of pro-inflammatory factors by human adipose tissue non-immune cells. **(a-c)** Concentrations of 9 secreted factors were quantified by Luminex technology in cultured pre-adipocytes (n = 6), CD31<sup>+</sup> endothelial cells (n = 6) and adipocytes (n = 7) in basal conditions. **(d-f)** Concentrations of 9 secreted factors in cells treated by rIL-17 (10 ng/mL) or rIL-1β (10 ng/mL). Stimulated rates of release were significantly increased ( $P < 0.05$ ) compared to basal condition, except for CCL20, CXCL1 and IL-8 in response to rIL-17 in pre-adipocytes. \* $P < 0.05$  versus cells treated by rIL-17. **(g)** Basal and rIL-17-stimulated IL-1β release in cells described above. \* $P < 0.05$  versus basal condition. Data are shown as mean  $\pm$  SEM.

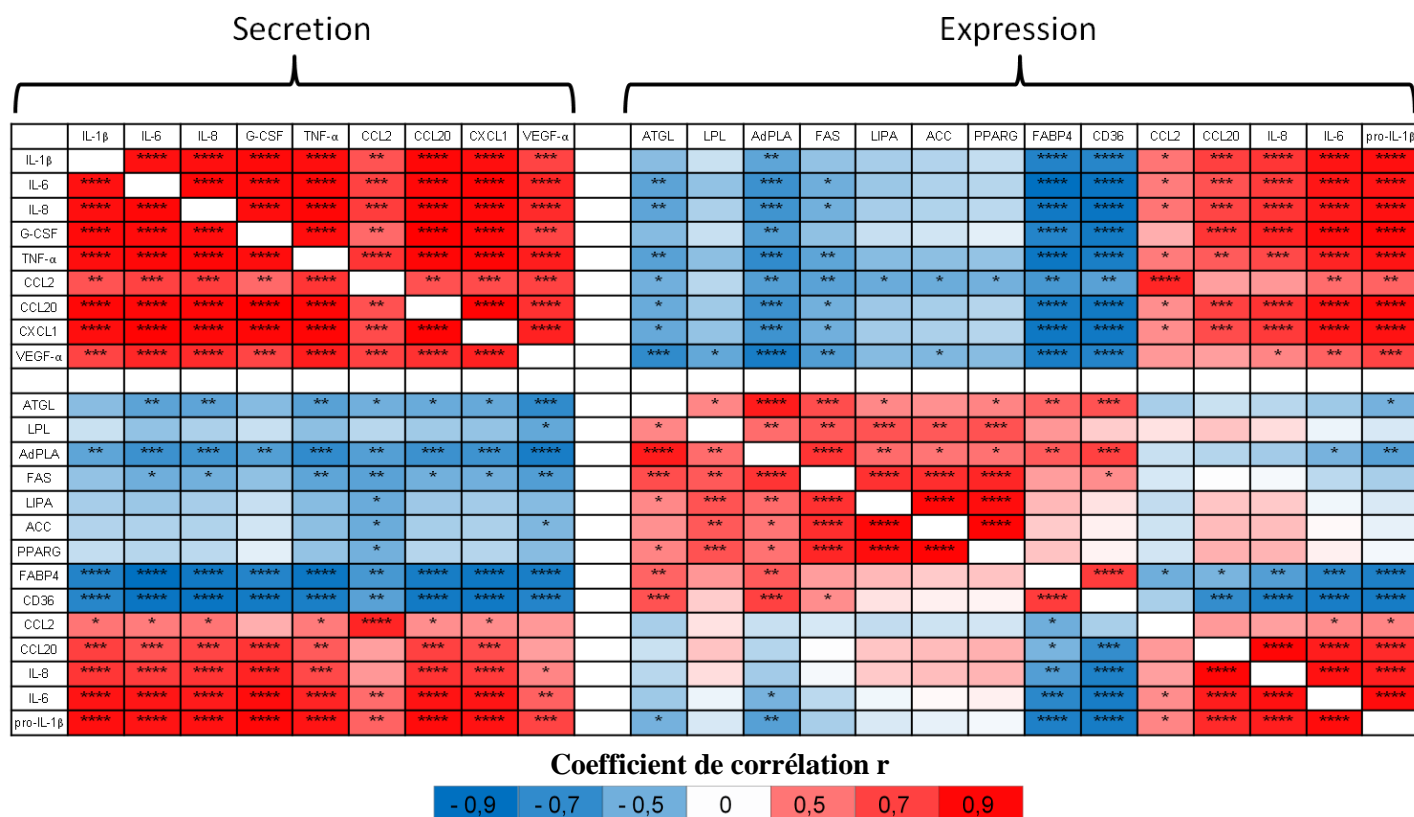


**Figure 4.** Low impact of IL-17 or IL-1β on extracellular matrix and fibrotic gene expression. (**a,d**) extracellular matrix genes *COL3A1*, *FN1*, *COL1A1*, *COL4A1*, (**b,e**) pro-fibrotic genes *LOX*, *TGFβ1*, *PAI1*, *CTGF* and (**c,f**) remodeling factor genes *TIMP1*, *MMP2*, *MMP1* and *MMP3* were quantified by RT-qPCR in cultured pre-adipocytes (n = 10) and CD31<sup>+</sup> endothelial cells (n = 6) treated or not by rIL-17 (10 ng/mL), rIL-1β (10 ng/mL), rTGF-β1 (5 ng/mL) or with CD45<sup>+</sup> cell conditioned medium (CD45<sup>+</sup> CM) in presence of isotype or anti-IL-1β (αIL-1β) and anti-IL17 (αIL-17) neutralizing antibodies. \**P* < 0.05 versus basal condition. #*P* < 0.05 versus cells treated by CD45<sup>+</sup> cells CM + isotype. Data are shown as mean ± SEM.



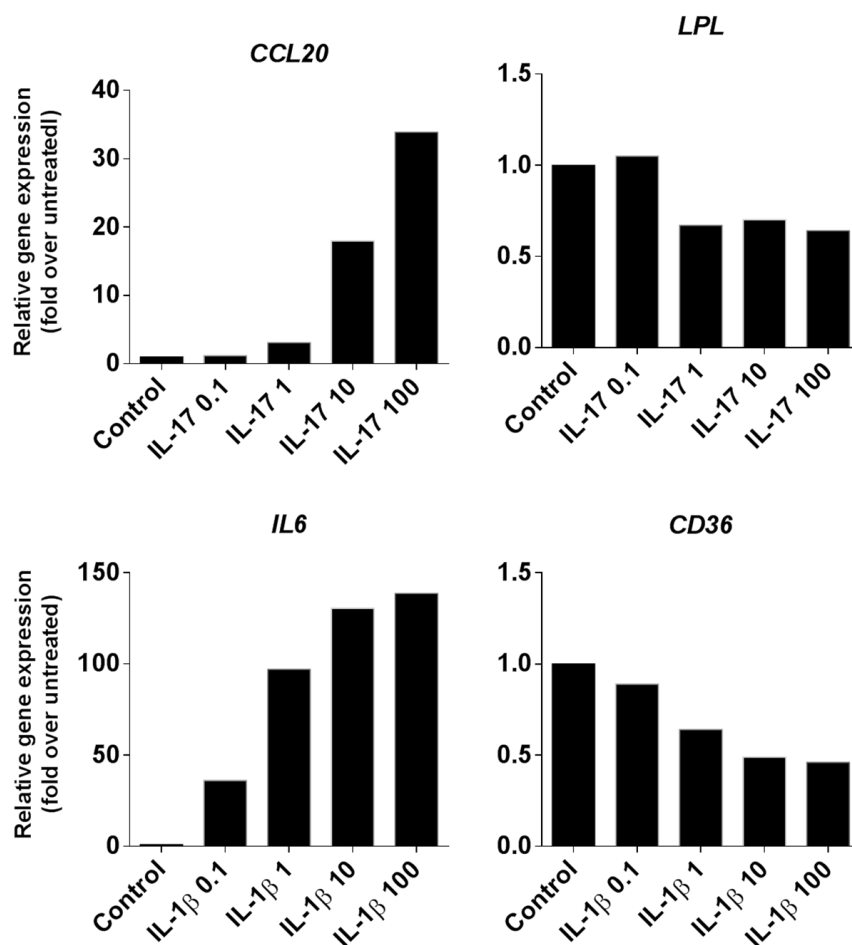
**Figure 5.** Down-regulation of metabolic genes in primary cultured adipocytes. **(a)** *GLUT1*, *PLIN1*, *LPL*, *FSP27*, *ATGL*, *AdPLA*, *ACC*, *FAS*, *LIPA*, *PPARG*, *FABP4* and *CD36* mRNA levels were quantified by QuantiGene Plex in adipocytes cultured in Puramatrix hydrogel for 72 h (n = 10) treated or not by rIL-17 (10 ng/mL) or rIL-1β (10 ng/mL). **Down-regulation was statistically significant ( $P < 0.05$  versus basal) for all genes, except when indicated (n.s).** \* $P < 0.05$  versus cells treated by rIL-17. **(b)** *FAS*, *LIPA*, *ACC*, *CD36*, *FABP4* and *PPARG* mRNA in adipocytes in presence of CD45<sup>+</sup> cells conditioned medium (CD45<sup>+</sup> CM), with addition of isotype or anti-IL-1β (αIL-1β) and anti-IL17 (αIL-17) neutralizing antibodies (n = 6). Down-regulation was statistically significant ( $P < 0.05$  versus basal) for all genes. # $P < 0.05$  versus CD45<sup>+</sup> CM + isotype. **(c,d)** Relationship between mRNA levels geometric means of metabolic (*CD36* and *FABP4*) and inflammation related genes (*CCL20*, *IL-8*, *IL-6* and *pro-IL-1β*) determined in the culture conditions described above. Data are shown as mean ± SEM. n.s: not significant.

## Résultats complémentaires



**Figure 27 : Corrélation entre la sécrétion et l'expression génique dans les adipocytes matures**

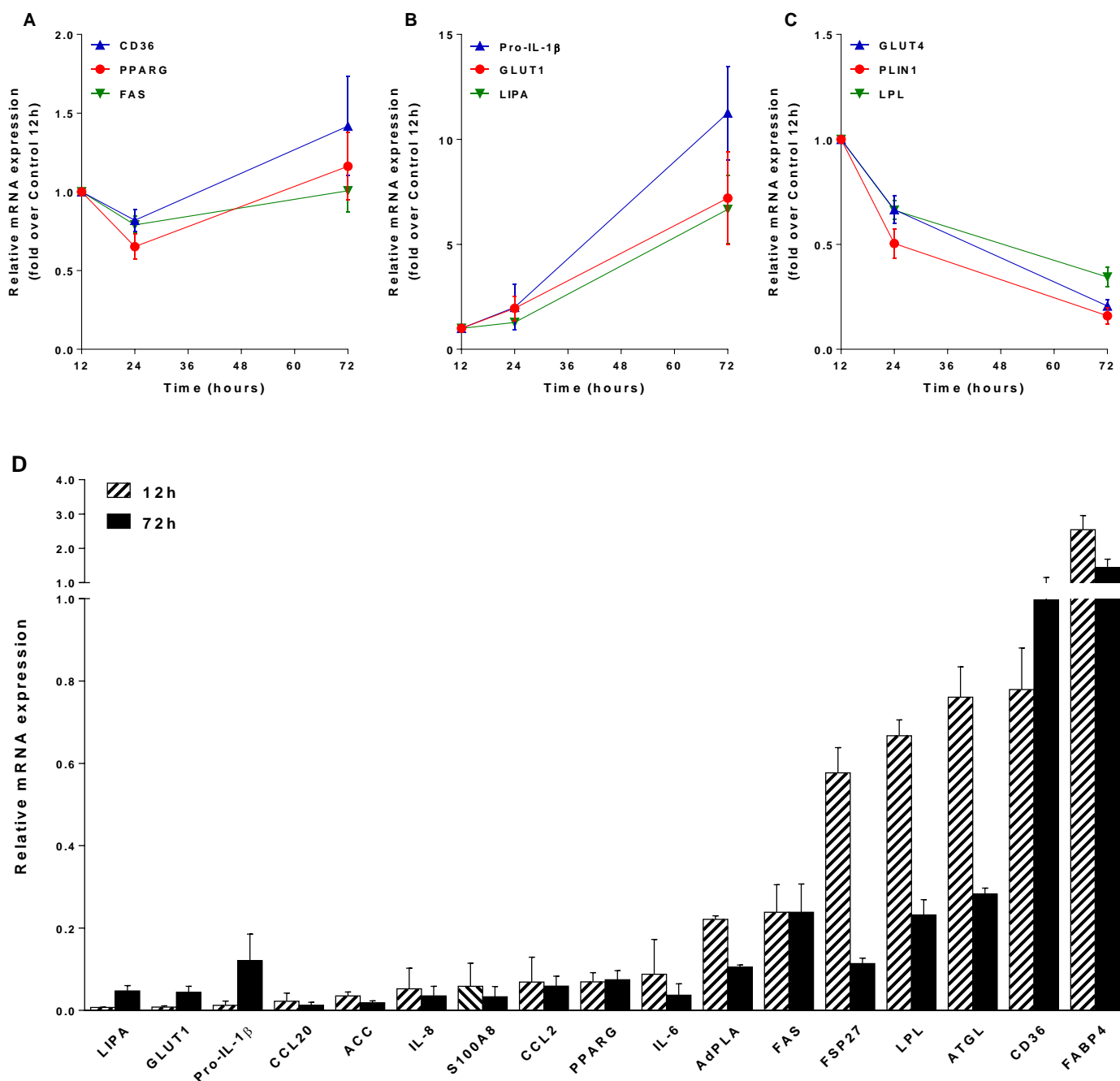
Corrélation entre la sécrétion et l'expression génique dans les adipocytes matures cultivés seuls, en présence d'IL-17, ou en présence d'IL-1 $\beta$  (n = 10 pour chaque condition). \* $P$  < 0,05 ; \*\* $P$  < 0,01 ; \*\*\* $P$  < 0,001 ; \*\*\*\* $P$  < 0,0001. L'IL-17 et l'IL-1 $\beta$  sont à 10 ng/mL.



**Figure 28 : Doses réponses d'IL-17 et d'IL-1β dans des adipocytes matures**

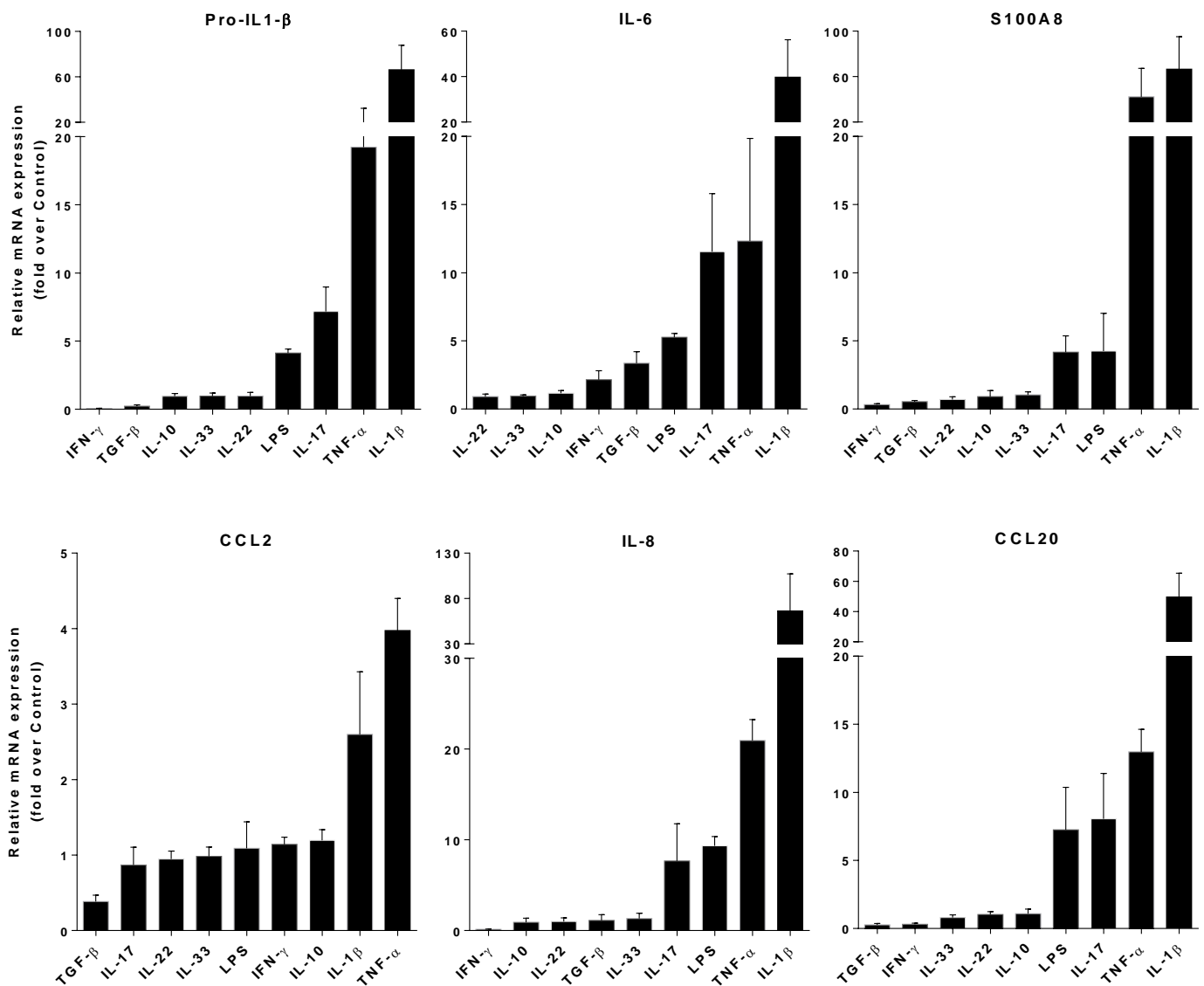
Expression génique relative de gènes de l'inflammation et du métabolisme après 72 heures culture dans des adipocytes matures traités avec différentes concentrations d'IL-17 ou d'IL-1β (de 0,1 à 100 ng/mL) en fonction de la condition non traitée. Les données représentent 1 préparation d'adipocytes.





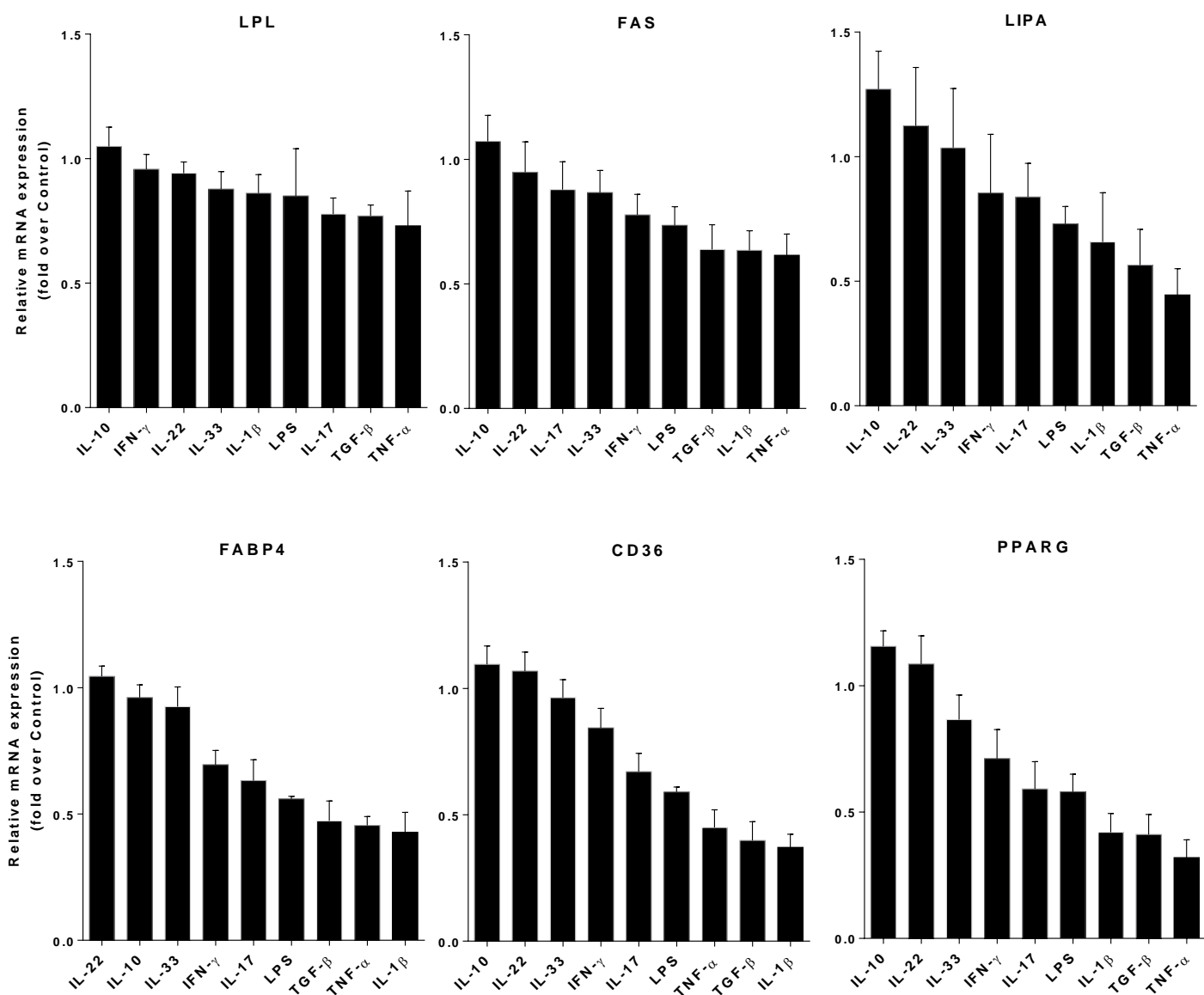
**Figure 29 : Cinétique d'expression génique d'adipocytes matures « contrôles »**

(A-C) Cinétique d'expression génique relative dans des adipocytes matures non traités après 24 et 72 heures de culture en fonction de l'expression à 12 heures. (D) Expression génique relative dans des adipocytes matures non traités après 12 et 72 heures de culture. Les données représentent la moyenne  $\pm$  SEM de 5 préparations d'adipocytes différentes.



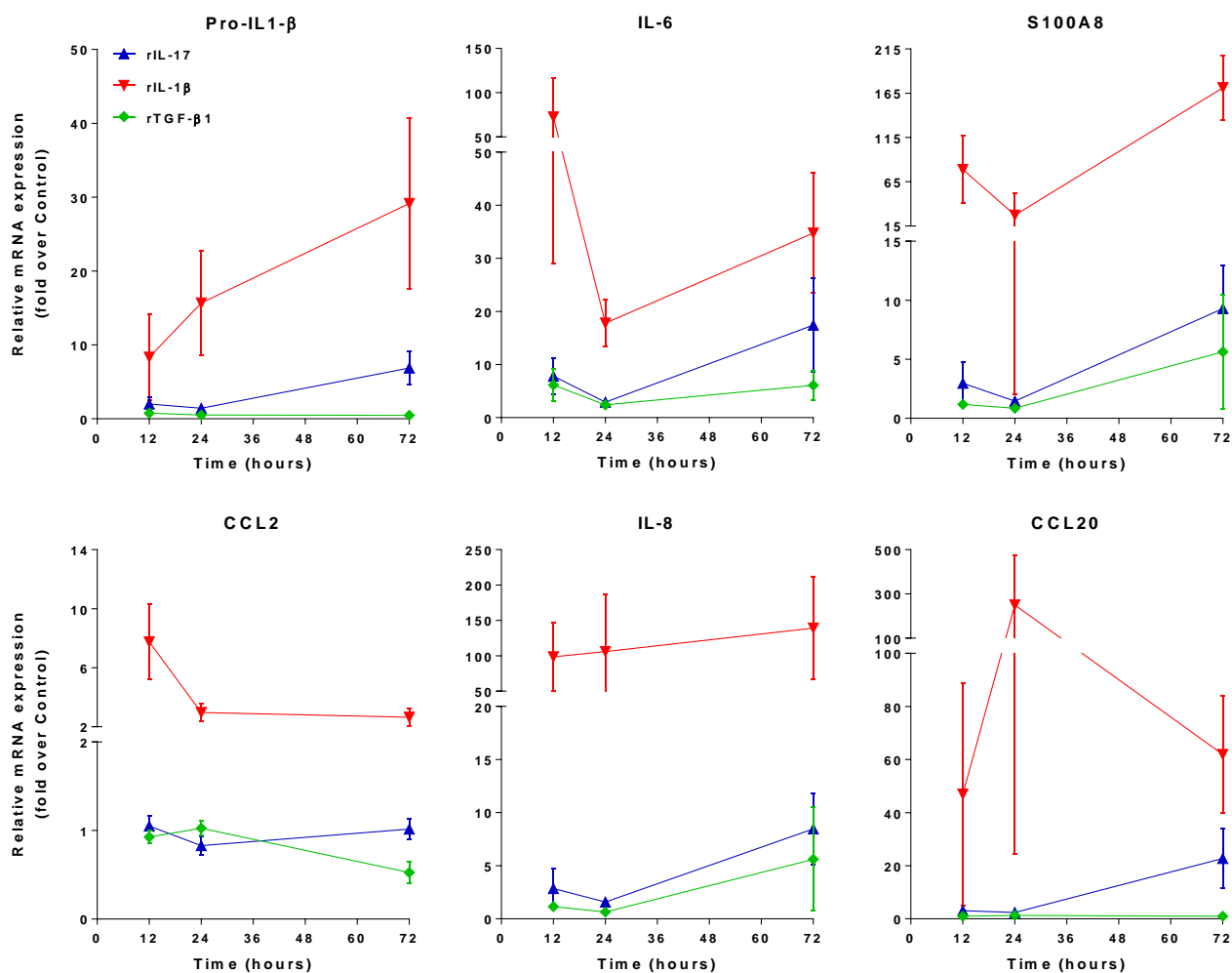
**Figure 30 : Impact inflammatoire de différentes cytokines sur des adipocytes matures**

Expression génique relative après 72 heures de culture de 6 molécules inflammatoires dans des adipocytes matures traités avec différentes cytokines en fonction de la condition non traitée. Les données représentent la moyenne  $\pm$  SEM de 8 préparations d'adipocytes différentes (sauf pour TNF- $\alpha$  et LPS n = 2). Toutes les cytokines sont à 10 ng/mL, sauf le TGF- $\beta$ 1 à 5 ng/mL.



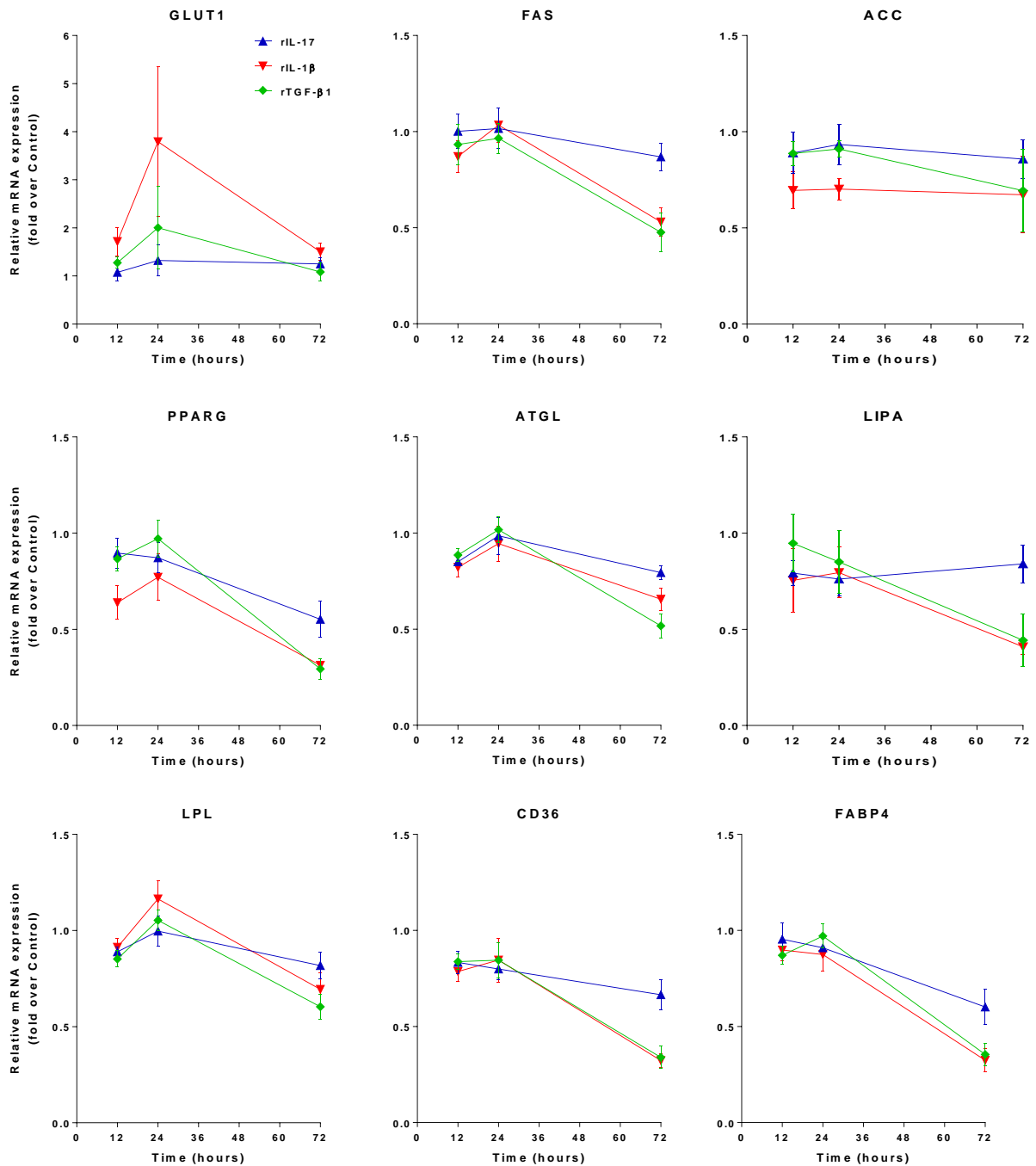
**Figure 31 : Impact métabolique de différentes cytokines sur des adipocytes matures**

Expression génique relative après 72 heures de culture de 6 gènes du métabolisme dans des adipocytes matures traités avec différentes cytokines en fonction de la condition non traitée. Les données représentent la moyenne  $\pm$  SEM de 8 préparations d'adipocytes différentes (sauf pour TNF- $\alpha$  et LPS  $n = 2$ ). Toutes les cytokines sont à 10 ng/mL, sauf le TGF- $\beta$ 1 à 5 ng/mL.



**Figure 32 : Cinétique d'expression génique inflammatoire d'adipocytes matures traités avec des cytokines**

Cinétique d'expression génique de 6 molécules inflammatoires dans des adipocytes matures traités avec des cytokines après 12, 24 et 72 heures de culture en fonction de la condition non traitée. Les données représentent la moyenne  $\pm$  SEM de 5 préparations d'adipocytes différentes. L'IL-17 et l'IL-1 $\beta$  sont à 10 ng/mL, le TGF- $\beta$ 1 est à 5 ng/mL.



**Figure 33 : Cinétique d'expression génique métabolique d'adipocytes matures traités avec des cytokines**

Cinétique d'expression génique de 9 gènes du métabolisme dans des adipocytes matures traités avec des cytokines après 12, 24 et 72 heures de culture en fonction de la condition non traitée. Les données représentent la moyenne  $\pm$  SEM de 5 préparations d'adipocytes différentes. L'IL-17 et l'IL-1 $\beta$  sont à 10 ng/mL, le TGF- $\beta$ 1 est à 5 ng/mL.

# **Discussion et conclusion**



## Discussion et conclusion

### Discussion et perspectives

Ce travail de thèse détaille certains aspects de l'implication des cellules immunitaires, en particulier des LT CD4<sup>+</sup> de type Th17, sur la triade délétère dans le TA au cours de l'obésité, c'est-à-dire l'inflammation, la fibrose, et le dysfonctionnement métabolique.

Un des atouts majeurs de ce projet a été de privilégier une approche expérimentale chez l'humain, intégrant des études cliniques, tissulaires et cellulaires grâce aux bioressources obtenues chez des individus obèses participant à un programme de chirurgie gastrique, ainsi qu'à du TA d'individus minces subissant une liposuction.

En effet, la plupart des études actuelles proviennent de modèles de souris alors que les systèmes immunitaires des souris et des humains sont évidemment très différents. Par exemple, chez l'humain, environ 2/3 des leucocytes sanguins sont des neutrophiles et 1/3 sont des lymphocytes, alors que c'est l'inverse chez la souris. De plus, avec l'utilisation de modèles de souris transgéniques, nous sous-estimons la complexité des processus mis en jeu dans la pathologie de l'obésité.

Ainsi, bien que certains traits de l'inflammation tels que l'accumulation de macrophages sont retrouvés dans le TA obèse humain, la principale difficulté est de transposer les résultats de précliniques obtenus chez la souris à des essais de traitements thérapeutiques chez les individus obèses et DT2.

Nous avons donc tenté d'analyser les changements dans la composition des cellules immunitaires du TA humain au cours de l'obésité et d'étudier l'impact de ces changements sur la biologie de cellules primaires humaines jouant un rôle fondamental dans le TA.

#### 1) Composition et « dialogue » immunitaire

Tout d'abord, dans la première étude (Dalmas et al., 2014), nous avons mis en évidence une augmentation de l'inflammation des macrophages dans le TA viscéral chez les individus obèses comparé aux individus minces, qui est accrue chez les individus obèses DT2. Cela se traduit par l'augmentation de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par ces macrophages qui est une cytokine impliquée dans différentes pathologies inflammatoires (Dinarello, 2009), mais également dans la résistance à l'insuline chez la souris (Jager et al., 2007; McGillicuddy et al., 2009; Stienstra et al., 2011b; Vandanmagsar et al., 2011), et dans les adipocytes différenciés humains (Gao et al., 2014; Lagathu et al., 2006). De plus, cette sécrétion d'IL-1 $\beta$  par des explants de TA est diminuée après une perte de



poids induite par chirurgie bariatrique, ce qui est cohérent avec une diminution des complications métaboliques, y compris le DT2, observée après ce « traitement » chirurgical (Frühbeck, 2015).

Ensuite, en étudiant la signature cytokinique des LT du TA, nous avons constaté une augmentation du pourcentage des LT  $CD4^+IL-17^+IL-22^+$  dans le TA viscéral obèse comparé au TA d'individus minces, et ce en relation avec la détérioration de l'homéostasie glucidique. Or, il avait déjà été montré que les individus obèses insulino-résistants ont un pourcentage plus élevé de LT  $CD4^+IL-17^+IL-22^+$  dans le TA sous-cutané que les individus minces ou obèses « métaboliquement sains » (Fabbrini et al., 2013).

Finalement, grâce à différentes expériences de culture cellulaire en présence de cytokines recombinantes et de co-cultures en présence ou non d'anticorps neutralisants nous avons mis en évidence, d'une part, que l' $IL-1\beta$  dérivée des macrophages stimule spécifiquement la sécrétion de l' $IL-17$  et de l' $IL-22$  par les LT  $CD4^+$  du TA, mais pas de l' $IFN-\gamma$ , et, d'autre part, que l' $IL-22$  sécrétée par ces lymphocytes peut également induire une sécrétion accrue d' $IL-1\beta$  par les macrophages.

Ainsi, le rôle pro-inflammatoire et insulino-résistant de l' $IL-1\beta$  dans le TA viscéral humain pourrait être exacerbé par des effets indirects relayés par l' $IL-17$  et l' $IL-22$  sécrétées par les Th17.

## 2) Microenvironnement « pro-Th17 » du tissu adipeux obèse

Dans un deuxième temps, nous avons voulu comprendre quels mécanismes pouvaient induire cette augmentation du pourcentage des LT  $CD4^+IL-17^+IL-22^+$  dans le TA viscéral obèse. Pour cela, nous avons analysé le microenvironnement cytokinique de TA viscéral d'individus minces et d'individus obèses, et étudié leurs impacts sur l'activation/polarisation de LT  $CD4^+$  centraux mémoires (LT4 Cm) circulants d'un individu sain. Tout d'abord, nous avons observé que le TA viscéral, mince ou obèse, sécrète peu de molécules inflammatoires détectables (**Tableau 5**). Cela pourrait être dû à nos conditions de culture, en effet on cultive les explants dans du milieu basal pour cellules endothéliales (ECBM) plus propice à la survie des cellules non-immunitaires du TA, alors qu'une récente étude a montré une sécrétion, entre autres, d' $IL-23$  et d' $IL-17$  dans des explants de TA viscéral d'individus obèses (Pandolfi et al., 2016). Cependant on observe une sécrétion accrue d' $IL-1\beta$  et d' $IL-6$  par les explants de TA obèses (**Figure 24**), deux cytokines connues pour être impliquées dans la polarisation des Th17 (Acosta-Rodriguez et al., 2007; Laurence and O'Shea, 2007; Yang et al., 2008 Nature). Or, après avoir cultivé des LT4 Cm en présence de ces milieux conditionnés, on a constaté une augmentation simultanée de leur sécrétion d' $IL-17A$  et d' $IL-17F$  spécifiquement avec les milieux conditionnés d'explants de TA obèse (**Figure 25**). De plus, la sécrétion accrue de CCL20 par les explants de TA obèses comparés à ceux d'individus minces pourrait également contribuer à un recrutement des Th17 circulants dans le TA au cours de l'obésité, en sachant que ces lymphocytes expriment le récepteur CCR6 spécifique de cette chimiokine (Baba et al., 1997; Hirota et al., 2007;

Singh et al., 2008). Finalement, la sécrétion d'IL-17A et d'IL-17F par les LT4 Cm est corrélée avec les concentrations d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6 présents dans les explants de TA (**Figure 26**). Ainsi, l'accumulation de Th17 dans le TA viscéral obèse pourrait résulter, d'une part, à un recrutement actif *via* la forte sécrétion de CCL20 et, d'autre part, à un microenvironnement cytokinique « pro-Th17 » dû à l'augmentation des concentrations d'IL-6 et d'IL-1 $\beta$  comme nous l'avons observé, mais également de TGF- $\beta$ 1 et d'IL-23 comme le suggèrent des études chez la souris (Chen et al., 2014) et chez l'humain (Pandolfi et al., 2016).

Finalement, l'ensemble de nos résultats nous ont incité à approfondir nos analyses sur l'impact des Th17, mais également de l'IL-1 $\beta$ , dans la physiopathologie du TA au cours de l'obésité.

### **3) Impact des cytokines IL-17 et IL-1 $\beta$ sur les cellules non-immunitaires du tissu adipeux**

Ainsi, dans une troisième étude, nous avons analysé l'impact des cytokines IL-17 et IL-1 $\beta$  sur les trois types de cellules non-immunitaires du TA. Pour cela, nous avons utilisé trois modèles de cellules primaires humaines, bien caractérisés en sein de notre laboratoire, les pré-adipocytes (Keophiphath et al., 2009; Lacasa et al., 2007), les cellules endothéliales CD31<sup>+</sup> (Pellegrinelli et al., 2014a; Rouault et al., 2013), et les adipocytes matures cultivés en 3D dans un hydrogel (Pellegrinelli et al., 2014b, 2015). Ces trois types de cellules primaires humaines ont été obtenus à partir de TA sous-cutané provenant de liposuccion. Nous avons cultivé ces trois types cellulaires avec des cytokines recombinantes humaines ou en présence de milieu conditionné de cellules immunitaires CD45<sup>+</sup> obtenues à partir de TA viscéral obèse afin de refléter l'état physiopathologique cytokinique dans lequel se trouvent ces cellules au cours de l'obésité. Finalement, nos analyses ont porté sur trois altérations majeures du TA obèse : l'inflammation dans les trois types cellulaires, la fibrose dans les pré-adipocytes et les cellules endothéliales, et le métabolisme dans les adipocytes.

Il faut tout d'abord noter que nous n'avons pas pu étudier l'impact de l'IL-22 sur ces trois modèles cellulaires car l'expression de son récepteur spécifique, l'IL-22RA1, n'est pas présente sur les cellules en culture. En effet, bien que nous ayons observé une expression de l'IL-22RA1 sur les cellules CD45<sup>+</sup> non-immunitaires du TA, comprenant entre autre des pré-adipocytes et des cellules endothéliales, son expression est perdue durant la culture comme cela a déjà été observé dans des keratinocytes humains (Tohyama et al., 2009). En revanche, nos trois modèles cellulaires expriment les récepteurs IL-1R1 et IL-17RA en culture, permettant ainsi une étude de l'effet de nos cytokines d'intérêt IL-1 $\beta$  et IL-17.

Dans un premier temps, nos résultats révèlent un fort impact inflammatoire de l'IL-17, mais encore plus de l'IL-1 $\beta$ , sur les pré-adipocytes, les cellules endothéliales et les adipocytes matures. En effet, en réponse aux cytokines recombinantes, les cellules endothéliales et les adipocytes matures expriment et

sécrètent de nombreuses molécules inflammatoires telles que les chimiokines CCL2, qui induit un recrutement des monocytes, l'IL-8 qui induit principalement une neutrophilie tissulaire, et CCL20 qui comme discuté précédemment peut induire un recrutement de lymphocytes dont les Th17. De plus, on observe également une expression et une sécrétion accrue du TNF- $\alpha$ , de l'IL-6 dans nos trois types cellulaires. Ici, l'IL-1 $\beta$  et l'IL-17 sont des acteurs importants d'un potentiel cercle vicieux recrutement immunitaire et inflammation chronique. Finalement, les adipocytes semblent être une des cibles principales de ces deux cytokines car les effets inflammatoires médiés par les milieux conditionnés de cellules immunitaires CD45<sup>+</sup>, qui reproduisent ceux induits par les cytokines recombinantes, sont très fortement inhibés en présence d'anticorps neutralisants anti-IL-17/IL-1 $\beta$ .

Nous avons également observé que la pro-IL-1 $\beta$  est l'un des gènes les plus induits par la cytokine IL-1 $\beta$  elle-même, ce qui étaye l'auto-amplification bien établie de cette cytokine (Dinarello et al., 1983; Weber et al., 2010), même si nous n'avons pas le confirmé en sécrétion en raison de la présence de la cytokine recombinante dans les milieux de sécrétion. Or, de façon intéressante, l'IL-17 peut augmenter la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  mature par les trois types cellulaires d'un facteur 2. Ainsi, cela étend les cibles cellulaires du « dialogue » paracrine délétère médié par ces deux cytokines dans le TA humain.

Ensuite, en raison de l'effet délétère de la fibrose au sein du TA au cours de l'obésité (Sun et al., 2013) et de son association avec l'inflammation chronique, nous nous sommes intéressés à un éventuel rôle pro-fibrotique de ces deux cytokines sur les cellules majeures de la fibrogenèse du TA que sont les pré-adipocytes et les cellules endothéliales (Keophiphath et al., 2009; Divoux et al., 2010; Reggio et al., 2016). Récemment, une autre étude de notre équipe a proposé une contribution des composants de la membrane basale, comme le collagène de type IV, dans cette fibrose (Reggio et al., 2016). Tout d'abord, conformément aux observations précédentes (Bourlier et al., 2012; Keophiphath et al., 2009; Reggio et al., 2016), nous avons observé que ces deux types cellulaires répondaient bien à un stimulus pro-fibrotique, en réponse à la cytokine recombinante TGF- $\beta$ 1. En revanche, ni les cytokines IL-17 et IL-1 $\beta$ , ni les milieux conditionnés de cellules immunitaires CD45<sup>+</sup> n'ont de réel impact pro-fibrotique sur ces deux types cellulaires. Alors que ces cytokines ont été impliquées dans l'induction de la fibrose dans différents tissus, comme dans les poumons (Mi et al., 2011; Wilson et al., 2010), leur potentiel fibrogénique semble être spécifique du type cellulaire ou du milieu inflammatoire tissulaire. Cependant, l'IL-1 $\beta$  induit très fortement l'expression des MMPs dans les pré-adipocytes et les cellules endothéliales, et cet effet est reproduit par milieux conditionnés de cellules immunitaires CD45<sup>+</sup>. Or, il a déjà été montré que l'IL-1 $\beta$  dérivée des macrophages augmente l'expression et la sécrétion des MMP-1 et MMP-3 dans le pré-adipocytes humains (Gao and Bing, 2011). Bien que les rôles des MMPs dans la physiopathologie du TA au cours de l'obésité soient peu connus, leur fonction principale de dégradation des collagènes et ainsi de remodelage de la matrice extracellulaire pourrait favoriser l'infiltration de cellules immunitaires, contribuant ainsi indirectement à des effets pro-inflammatoires de l'IL-1 $\beta$ .

Finalement, au sein du TA, les adipocytes sont exposés à de nombreux facteurs, notamment des cytokines, des métabolites, des hormones et ainsi que des polluants, qui affectent leur capacité métabolique et leurs fonctions cellulaires. Or, dans cette étude nous avons observé que l'IL-17 et de façon plus notable l'IL-1 $\beta$  induisent un état catabolique dans les adipocytes matures, en inhibant un certain nombre de gènes impliqués dans la lipogenèse et la lipolyse. De plus, les milieux conditionnés de cellules immunitaires CD45<sup>+</sup> induisent la même diminution métabolique que celle induite par l'IL-1 $\beta$ , mais cet effet n'est que partiellement bloqué par la neutralisation de l'IL-17 et l'IL-1 $\beta$ . Ainsi, le TNF- $\alpha$  et/ou l'IL-6 sont des candidats susceptibles de contribuer aux effets induits par le milieu conditionné de CD45<sup>+</sup> en raison de leurs caractéristiques bien établies à induire l'inflammation et la résistance à l'insuline dans les adipocytes et au niveau systémique (Hotamisligil, 2006). Ainsi, il reste à déterminer si la diminution du métabolisme dans les adipocytes en présence d'IL-17 et d'IL-1 $\beta$  est directe ou secondaire à une libération accrue de TNF- $\alpha$  et/ou d'IL-6 par ces mêmes adipocytes. De plus, on a constaté une relation inverse entre l'inflammation des adipocytes et l'expression de certains gènes métaboliques, principalement du CD36 et du FABP4. En raison de leur implication dans l'absorption des acides gras et le transport intracellulaire (Furuhashi and Hotamisligil, 2008; Hajri and Abumrad, 2002), la diminution de l'expression du CD36 et du FABP4 pourrait contribuer à déréguler le stockage et le relargage lipidique par les adipocytes.

Cytokines	Etudes	Adipocytes	Impacts
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	(Lagathu et al., 2006)	3T3-F442A 3T3-L1 Pré-adipocytes de TA sous-cutané humain différenciés	< pIR $\beta$ , pIRS-1, pAkt, pERK1/2 < Transport du glucose et accumulation lipidique > Relargage de glycérol < Gènes <b>GLUT4</b> , <b>FAS</b> , <b>ACC</b> , <b>FABP4</b> et <b>LPL</b>
	(Jager et al., 2007)	3T3-L1 Pré-adipocytes de TA sous-cutané humain différenciés	> Translocation de GLUT1, absorption basale de glucose, pERK1/2 et pp38 < Absorption de glucose induite par l'insuline < <b>GLUT4</b> et pIRS-1
	(Gao et al., 2014)	3T3-L1 Pré-adipocytes de TA sous-cutané humain différenciés	< Gènes du métabolisme, IRS-1, PI3K > Gènes et sécrétion de molécules de l'inflammation
<b>IL-17</b>	(Zúñiga et al., 2010)	3T3-L1	< Adipogenèse et gènes du métabolisme
	(Ahmed and Gaffen, 2013)	3T3-L1	< Adipogenèse et gènes du métabolisme
	(Qu et al., 2016)	3T3-L1	> Gènes du métabolisme > Gènes de l'inflammation
<b>IL-22</b>	(Wang et al., 2011)	3T3-L1	> pERK > Gènes <b>IL-1<math>\beta</math></b> et IL-10

**Tableau 6 : Impacts de l'IL-1 $\beta$ , l'IL-17 et l'IL-22 sur différents modèles d'adipocytes matures en culture**

(La plupart des études de l'impact de nos cytokines d'intérêts sur les adipocytes matures en culture ont été réalisées dans le modèle murin 3T3-L1 ou dans des pré-adipocytes de TA sous-cutané humain différenciés. On peut voir en rouge les résultats similaires à ceux obtenus dans notre étude).

Nous avons un peu poussé nos investigations dans les adipocytes matures. En effet, grâce à la méthode de la culture en 3D développée au sein de notre laboratoire et breveté (Brevet US20130183706) nous avons pu cultiver et étudier des adipocytes matures humains sur plusieurs jours. Or, la plupart des résultats sur les adipocytes proviennent d'études sur des 3T3-L1 ou des pré-adipocytes humains différenciés *in vitro*. Nous avons tout d'abord observé une forte corrélation entre les différentes molécules inflammatoires, que ce soit au niveau de l'expression génique ou de la sécrétion (**Figure 27**). Au niveau du métabolisme, les principaux gènes qui corrélaient négativement avec l'inflammation sont CD36 et FABP4 comme discuté précédemment. Ensuite, en effectuant des doses réponses, nous avons observé que l'IL-17 peut induire encore plus d'inflammation à 100 ng/mL même si cette dose n'est pas physiologique, par contre l'IL-1 $\beta$  induit une inflammation dès 0,1 ng/mL et il y a un plateau à partir de 10 ng/mL (**Figure 28**). On peut ainsi penser qu'à 10 ng/mL on est dans une bonne dose d'analyse. Par ailleurs, en étudiant la cinétique d'expression génique dans les adipocytes matures, bien que certains gènes cruciaux restent constants en 12 et 72 h, comme PPAR $\gamma$ , il semble que des gènes

de « survie » augmentent au cours du temps, comme LIPA et GLUT1, alors que d'autres diminuent, comme PLIN1 et LPL (**Figure 29**). On peut ainsi imaginer que la sortie de ces adipocytes du TA et leur culture sans acides gras les poussent à utiliser leur réserve lipidique. Ensuite, nous avons étudié la réponse inflammatoire et métabolique de ces adipocytes en présence de nombreuses cytokines pro- et anti-inflammatoires considérées comme présentes dans le TA (**Figures 30, 31**). On observe que la principale cytokine pro-inflammatoire dans ces conditions de culture c'est l'IL-1 $\beta$ , suivie du TNF- $\alpha$ , et ensuite IL-17 et LPS. De façon intéressante, ni l'IFN- $\gamma$  ni le TGF- $\beta$ 1 n'induisent d'inflammation (et seraient même plutôt anti-inflammatoires), par contre le TGF- $\beta$ 1 induit une diminution du métabolisme du même ordre que celle induite par le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ . En outre, l'IL-10, l'IL-22 et l'IL-33 n'ont ni d'effet sur les gènes de l'inflammation ni sur ceux du métabolisme, il sera intéressant d'analyser l'expression de leur récepteur sur des adipocytes « frais » et après culture. En analysant l'effet de l'IL-17, l'IL-1 $\beta$  et du TGF- $\beta$ 1 sur ces mêmes gènes, mais en cinétique (**Figures 32, 33**), on observe que l'IL-1 $\beta$  initie l'inflammation avant de diminuer le métabolisme. Ainsi, on ne peut pas savoir si la diminution du métabolisme est un effet direct de l'IL-1 $\beta$  ou résulte d'un effet indirect de l'augmentation de TNF- $\alpha$  par exemple. En tout cas, le TGF- $\beta$ 1 semble pouvoir induire une diminution du métabolisme sans forcément induire une inflammation. Pour conclure, l'IL-17 induit une inflammation et une diminution du métabolisme, mais l'effet de l'IL-1 $\beta$  sur ces deux mécanismes est

### *Limitations*

Dans nos études, on peut principalement critiquer le fait que nous avons sélectionné les cellules immunitaires à partir de billes magnétiques, ainsi il peut y avoir des contaminations cellulaires. De plus, nous aurions pu tester la culture d'adipocytes matures en présence d'acides gras afin de limiter le stress de leur « retrait » du TA. Finalement, malgré des tentatives d'analyses fonctionnelles telles que la phosphorylation d'Akt en réponse à l'insuline ou le relargage du glycérol en réponse à de l'isoprotérénol nous n'avons pas obtenu de résultats analysables.

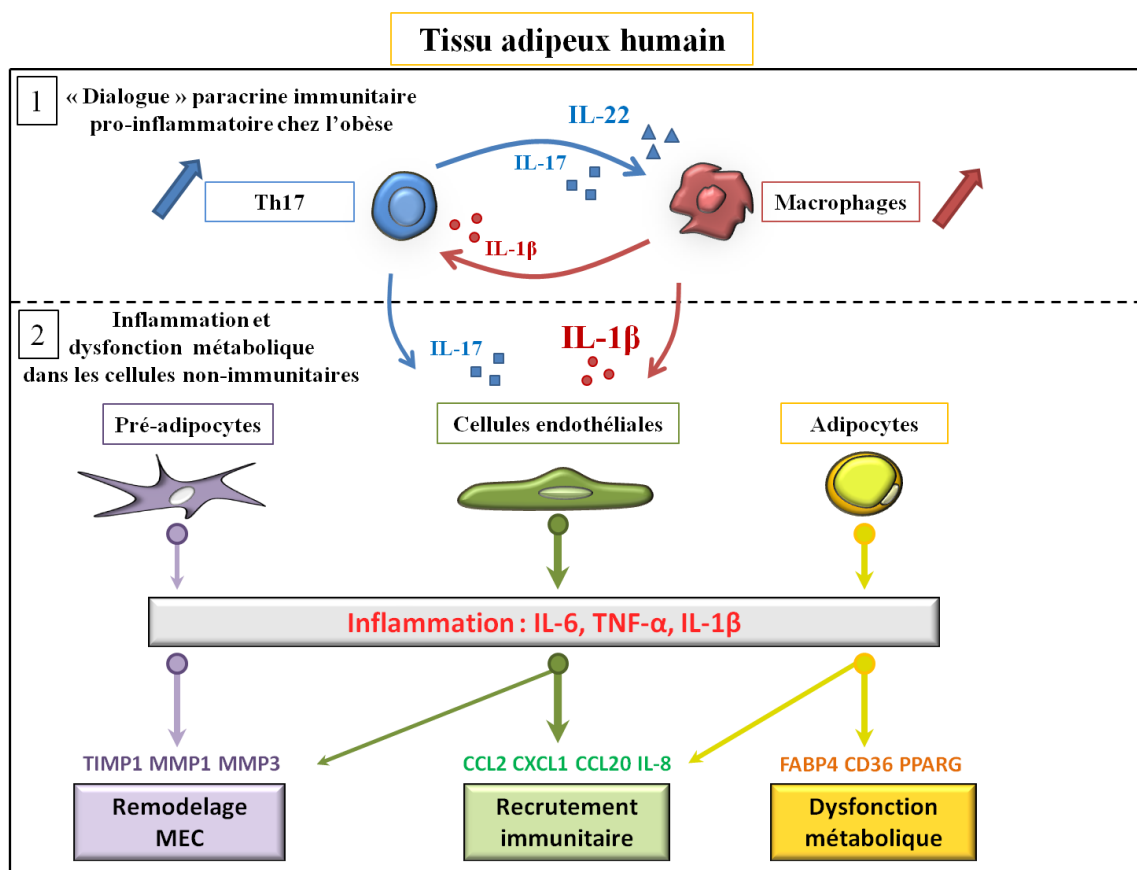
### *Perspectives*

Tout d'abord, cela pourrait être intéressant de travailler sur un modèle de souris et de vérifier l'impact de l'IL-17 « spécifiquement » dans le TA. En effet, la grande majorité des résultats chez la souris sont obtenus à partir de modèles transgéniques avec une délétion totale pour le gène d'intérêt. Or, il existe à l'heure actuelle des méthodes afin d'analyser l'invalidation d'un gène dans un tissu spécifique, ce qui est très attractif. De plus, il faudrait essayer de mieux comprendre le rôle de l'IL-22 dans le TA, car bien que nous ayons observé un effet pro-inflammatoire de cette cytokine sur les macrophages nous n'avons pas pu étudier son impact sur les cellules non-immunitaires alors qu'elles expriment son récepteur *in vivo*. Or, une étude a montré son rôle protecteur sur les cellules  $\beta$  pancréatiques et sur le

DT2 chez la souris (Wang et al., 2014). Ainsi, les effets de l'IL-22 dépendent sûrement du tissu et des cellules comme cela est le cas pour l'IL-6 par exemple (Mauer et al., 2015). On peut donc se demander quel est l'impact systémique de l'augmentation des LT CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>IL-22<sup>+</sup> observée dans le sang des individus obèses (Zhao et al., 2014). Finalement, la perspective la plus intéressante serait de mettre en place un essai d'immunothérapie combiné. En effet, pour l'instant seul des « mono-traitements » anti-inflammatoires sont utilisés pour des essais cliniques contre l'obésité et le DT2. Actuellement, le traitement anti-IL-1 $\beta$  est l'intervention immunitaire ayant les meilleurs résultats dans le traitement du DT2 (Donath et al., 2013). Cependant, la complexité du système immunitaire et les différentes voies d'activation de l'inflammation inhibent les effets des traitements. Or, il a récemment été décrit qu'une approche combinée d'immunothérapie grâce à un anticorps bispécifique anti-IL-17/TNF- $\alpha$  pouvait avoir des résultats intéressants dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde chez des souris transgéniques humanisées et sur des cellules primaires humaines (Fischer et al., 2015). En outre, il y a un vrai développement de médicaments contre les maladies auto-immunes à base d'anti-IL-17 et/ou d'anti-TNF- $\alpha$  (Beringer et al., 2016). Finalement, on serait tenté de développer un essai d'immunothérapie combinée anti-IL-1 $\beta$ /IL-17 afin de lutter contre l'obésité et ses complications métaboliques associées.

## Conclusion

Pour conclure, nous avons mis en évidence l'existence d'une boucle pro-inflammatoire entre les macrophages et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th17 dans le tissu adipeux viscéral chez les individus obèses. Or, l'augmentation des cytokines IL-1 $\beta$  et IL-17 au cours de ce « dialogue » paracrine pro-inflammatoire peut induire une inflammation accrue dans les cellules non-immunitaires dans le tissu adipeux humain ainsi qu'une diminution du métabolisme adipocytaire (**Figure 34**). Nous ne pouvons pas exclure l'implication de plusieurs autres médiateurs pro-inflammatoires dans l'interaction complexe entre les cellules immunitaires et non-immunitaires conduisant aux altérations cellulaires et tissulaires du tissu adipeux obèse. Finalement, bien que l'IL-17 joue un rôle indéniable dans ce phénomène, l'IL-1 $\beta$  semble être le régulateur principal de l'état dysfonctionnel du tissu adipeux au cours de l'obésité humaine. Ces résultats sont des raisons supplémentaires de développer des essais thérapeutiques à base d'immunothérapie dans l'obésité humaine, peut-être en utilisant une combinaison innovante anti-IL-17/IL-1 $\beta$ .



**Figure 34 : « Dialogue » paracrine inflammatoire entre les cellules immunitaires et non-immunitaires du tissu adipeux humain : importance des Th17 et rôle majeur de l'IL-1 $\beta$**





# Références bibliographiques



## Références bibliographiques

Abraham, S.N., and St John, A.L. (2010). Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 440–452.

Acosta-Rodriguez, E.V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2007). Interleukins 1 $\beta$  and 6 but not transforming growth factor- $\beta$  are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat. Immunol.* *8*, 942–949.

Adams, K.F., Schatzkin, A., Harris, T.B., Kipnis, V., Mouw, T., Ballard-Barbash, R., Hollenbeck, A., and Leitzmann, M.F. (2006). Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old. *N. Engl. J. Med.* *355*, 763–778.

Adams, T.D., Gress, R.E., Smith, S.C., Halverson, R.C., Simper, S.C., Rosamond, W.D., Lamonte, M.J., Stroup, A.M., and Hunt, S.C. (2007). Long-term mortality after gastric bypass surgery. *N. Engl. J. Med.* *357*, 753–761.

Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M.-H., de Sauvage, F.J., and Gurney, A.L. (2003). Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J. Biol. Chem.* *278*, 1910–1914.

Ahmed, M., and Gaffen, S.L. (2013). IL-17 inhibits adipogenesis in part via C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$  and Krüppel-like factors. *Cytokine* *61*, 898–905.

Altintas, M.M., Azad, A., Nayer, B., Contreras, G., Zaias, J., Faul, C., Reiser, J., and Nayer, A. (2011). Mast cells, macrophages, and crown-like structures distinguish subcutaneous from visceral fat in mice. *J. Lipid Res.* *52*, 480–488.

Amano, S.U., Cohen, J.L., Vangala, P., Tencerova, M., Nicoloso, S.M., Yawe, J.C., Shen, Y., Czech, M.P., and Aouadi, M. (2014). Local proliferation of macrophages contributes to obesity-associated adipose tissue inflammation. *Cell Metab.* *19*, 162–171.

Amar, J., Burcelin, R., Ruidavets, J.B., Cani, P.D., Fauvel, J., Alessi, M.C., Chamontin, B., and Ferrières, J. (2008). Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *Am. J. Clin. Nutr.* *87*, 1219–1223.

American Heart Association Nutrition Committee, Lichtenstein, A.H., Appel, L.J., Brands, M., Carnethon, M., Daniels, S., Franch, H.A., Franklin, B., Kris-Etherton, P., Harris, W.S., et al. (2006). Diet and lifestyle recommendations revision 2006: a scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee. *Circulation* *114*, 82–96.

Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G.L., Metzler, K.D., and Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu. Rev. Immunol.* *30*, 459–489.

Angrisani, L., Santonicola, A., Iovino, P., Formisano, G., Buchwald, H., and Scopinaro, N. (2015). Bariatric Surgery Worldwide 2013. *Obes. Surg.* *25*, 1822–1832.

Apovian, C.M., Bigornia, S., Mott, M., Meyers, M.R., Ulloor, J., Gagua, M., McDonnell, M., Hess, D., Joseph, L., and Gokce, N. (2008). Adipose macrophage infiltration is associated with insulin resistance and vascular endothelial dysfunction in obese subjects. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *28*, 1654–1659.

- Arner, P., and Langin, D. (2014). Lipolysis in lipid turnover, cancer cachexia, and obesity-induced insulin resistance. *Trends Endocrinol. Metab.* **TEM** *25*, 255–262.
- Artis, D., and Spits, H. (2015). The biology of innate lymphoid cells. *Nature* **517**, 293–301.
- Ask, K., Bonniaud, P., Maass, K., Eickelberg, O., Margetts, P.J., Warburton, D., Groffen, J., Gauldie, J., and Kolb, M. (2008). Progressive pulmonary fibrosis is mediated by TGF-beta isoform 1 but not TGF-beta3. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 484–495.
- Attie, A.D., and Scherer, P.E. (2009). Adipocyte metabolism and obesity. *J. Lipid Res.* **50 Suppl**, S395–S399.
- Baba, M., Imai, T., Nishimura, M., Kakizaki, M., Takagi, S., Hieshima, K., Nomiyama, H., and Yoshie, O. (1997). Identification of CCR6, the specific receptor for a novel lymphocyte-directed CC chemokine LARC. *J. Biol. Chem.* **272**, 14893–14898.
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V., Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F., and Gordon, J.I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 15718–15723.
- Badimon, L., Oñate, B., and Vilahur, G. (2015). Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells and Their Reporative Potential in Ischemic Heart Disease. *Rev. Esp. Cardiol. Engl. Ed* **68**, 599–611.
- Bal, B.S., Finelli, F.C., Shope, T.R., and Koch, T.R. (2012). Nutritional deficiencies after bariatric surgery. *Nat. Rev. Endocrinol.* **8**, 544–556.
- Balkau, B., Deanfield, J.E., Després, J.-P., Bassand, J.-P., Fox, K.A.A., Smith, S.C., Barter, P., Tan, C.-E., Van Gaal, L., Wittchen, H.-U., et al. (2007). International Day for the Evaluation of Abdominal Obesity (IDEA): a study of waist circumference, cardiovascular disease, and diabetes mellitus in 168,000 primary care patients in 63 countries. *Circulation* **116**, 1942–1951.
- Bastelica, D., Morange, P., Berthet, B., Borghi, H., Lacroix, O., Grino, M., Juhan-Vague, I., and Alessi, M.-C. (2002). Stromal cells are the main plasminogen activator inhibitor-1-producing cells in human fat: evidence of differences between visceral and subcutaneous deposits. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 173–178.
- Basu, S., Eriksson, M., Pioli, P.A., Conejo-Garcia, J., Mselle, T.F., Yamamoto, S., Wira, C.R., and Sentman, C.L. (2009). Human uterine NK cells interact with uterine macrophages via NKG2D upon stimulation with PAMPs. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* **1989** *61*, 52–61.
- Baumgarth, N., Jager, G.C., Herman, O.C., and Herzenberg, L.A. (2000). CD4+ T cells derived from B cell-deficient mice inhibit the establishment of peripheral B cell pools. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 4766–4771.
- Beckman, E.M., Porcelli, S.A., Morita, C.T., Behar, S.M., Furlong, S.T., and Brenner, M.B. (1994). Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells. *Nature* **372**, 691–694.
- Belkaid, Y., and Hand, T.W. (2014). Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell* **157**, 121–141.
- Bell, C.G., Walley, A.J., and Froguel, P. (2005). The genetics of human obesity. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 221–234.

- Bell, L.N., Ward, J.L., Degawa-Yamauchi, M., Bovenkerk, J.E., Jones, R., Cacucci, B.M., Gupta, C.E., Sheridan, C., Sheridan, K., Shankar, S.S., et al. (2006). Adipose tissue production of hepatocyte growth factor contributes to elevated serum HGF in obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *291*, E843–E848.
- Bergman, R.N., Stefanovski, D., Buchanan, T.A., Sumner, A.E., Reynolds, J.C., Sebring, N.G., Xiang, A.H., and Watanabe, R.M. (2011). A better index of body adiposity. *Obes. Silver Spring Md* *19*, 1083–1089.
- Bergouignan, A., and Blanc, S. (2006). [The energetics of obesity]. *J. Société Biol.* *200*, 29–35.
- Berlinger, A., Noack, M., and Miossec, P. (2016). IL-17 in Chronic Inflammation: From Discovery to Targeting. *Trends Mol. Med.* *22*, 230–241.
- Berria, R., Wang, L., Richardson, D.K., Finlayson, J., Belfort, R., Pratipanawatr, T., De Filippis, E.A., Kashyap, S., and Mandarino, L.J. (2006). Increased collagen content in insulin-resistant skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *290*, E560–E565.
- Berrington de Gonzalez, A., Hartge, P., Cerhan, J.R., Flint, A.J., Hannan, L., MacInnis, R.J., Moore, S.C., Tobias, G.S., Anton-Culver, H., Freeman, L.B., et al. (2010). Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults. *N. Engl. J. Med.* *363*, 2211–2219.
- Bertola, A., Ciucci, T., Rousseau, D., Bourlier, V., Duffaut, C., Bonnafeous, S., Blin-Wakkach, C., Anty, R., Iannelli, A., Gugenheim, J., et al. (2012). Identification of adipose tissue dendritic cells correlated with obesity-associated insulin-resistance and inducing Th17 responses in mice and patients. *Diabetes* *61*, 2238–2247.
- Berzins, S.P., Smyth, M.J., and Baxter, A.G. (2011). Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 131–142.
- Beutler, B.A. (2009). TLRs and innate immunity. *Blood* *113*, 1399–1407.
- Bevan, M.J. (2004). Helping the CD8(+) T-cell response. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 595–602.
- Biernacka, A., Dobaczewski, M., and Frangogiannis, N.G. (2011). TGF- $\beta$  signaling in fibrosis. *Growth Factors Chur Switz.* *29*, 196–202.
- Birch, L.L. (1998). Psychological influences on the childhood diet. *J. Nutr.* *128*, 407S – 410S.
- Birch, L.L. (2006). Child feeding practices and the etiology of obesity. *Obes. Silver Spring Md* *14*, 343–344.
- Birch, L.L., and Davison, K.K. (2001). Family environmental factors influencing the developing behavioral controls of food intake and childhood overweight. *Pediatr. Clin. North Am.* *48*, 893–907.
- Birch, L.L., and Fisher, J.O. (2000). Mothers' child-feeding practices influence daughters' eating and weight. *Am. J. Clin. Nutr.* *71*, 1054–1061.
- Birch, L.L., Fisher, J.O., and Davison, K.K. (2003). Learning to overeat: maternal use of restrictive feeding practices promotes girls' eating in the absence of hunger. *Am. J. Clin. Nutr.* *78*, 215–220.
- Bischoff, S.C. (2007). Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 93–104.

- Biswas, S.K., and Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat. Immunol.* *11*, 889–896.
- Björntorp, P., Karlsson, M., Pertoft, H., Pettersson, P., Sjöström, L., and Smith, U. (1978). Isolation and characterization of cells from rat adipose tissue developing into adipocytes. *J. Lipid Res.* *19*, 316–324.
- Bogdanovic, E., Kraus, N., Patsouris, D., Diao, L., Wang, V., Abdullahi, A., and Jeschke, M.G. (2015). Endoplasmic reticulum stress in adipose tissue augments lipolysis. *J. Cell. Mol. Med.* *19*, 82–91.
- Bogoyevitch, M.A., Ngoei, K.R.W., Zhao, T.T., Yeap, Y.Y.C., and Ng, D.C.H. (2010). c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges. *Biochim. Biophys. Acta* *1804*, 463–475.
- Bolus, W.R., Gutierrez, D.A., Kennedy, A.J., Anderson-Baucum, E.K., and Hasty, A.H. (2015). CCR2 deficiency leads to increased eosinophils, alternative macrophage activation, and type 2 cytokine expression in adipose tissue. *J. Leukoc. Biol.* *98*, 467–477.
- Bouchard, C., and Pérusse, L. (1993). Genetic aspects of obesity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *699*, 26–35.
- Bouloumié, A., Curat, C.A., Sengenès, C., Lolmède, K., Miranville, A., and Busse, R. (2005). Role of macrophage tissue infiltration in metabolic diseases. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* *8*, 347–354.
- Bourlier, V., Sengenès, C., Zakaroff-Girard, A., Decaunes, P., Wdziekonski, B., Galitzky, J., Villageois, P., Esteve, D., Chiotasso, P., Dani, C., et al. (2012). TGFbeta family members are key mediators in the induction of myofibroblast phenotype of human adipose tissue progenitor cells by macrophages. *PloS One* *7*, e31274.
- Brahimi-Horn, M.C., and Pouyssegur, J. (2007). Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett.* *581*, 3582–3591.
- Brahimi-Horn, M.C., Chiche, J., and Pouyssegur, J. (2007). Hypoxia and cancer. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *85*, 1301–1307.
- Brahm, A.J., and Hegele, R.A. (2015). Chylomicronaemia--current diagnosis and future therapies. *Nat. Rev. Endocrinol.* *11*, 352–362.
- Bråkenhielm, E., Cao, R., Gao, B., Angelin, B., Cannon, B., Parini, P., and Cao, Y. (2004). Angiogenesis inhibitor, TNP-470, prevents diet-induced and genetic obesity in mice. *Circ. Res.* *94*, 1579–1588.
- Brestoff, J.R., Kim, B.S., Saenz, S.A., Stine, R.R., Monticelli, L.A., Sonnenberg, G.F., Thome, J.J., Farber, D.L., Lutfy, K., Seale, P., et al. (2015). Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity. *Nature* *519*, 242–246.
- Brewis, A.A. (2014). Stigma and the perpetuation of obesity. *Soc. Sci. Med.* *192*, 152–158.
- Brigl, M., and Brenner, M.B. (2004). CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu. Rev. Immunol.* *22*, 817–890.
- Brochu-Gaudreau, K., Rehfeldt, C., Blouin, R., Bordignon, V., Murphy, B.D., and Palin, M.-F. (2010). Adiponectin action from head to toe. *Endocrine* *37*, 11–32.
- Bromley, S.K., Mempel, T.R., and Luster, A.D. (2008). Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. *Nat. Immunol.* *9*, 970–980.

Bruun, J.M., Lihn, A.S., Pedersen, S.B., and Richelsen, B. (2005). Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 2282–2289.

Buchwald, H., and Williams, S.E. (2004). Bariatric surgery worldwide 2003. *Obes. Surg.* 14, 1157–1164.

Buchwald, H., Avidor, Y., Braunwald, E., Jensen, M.D., Pories, W., Fahrbach, K., and Schoelles, K. (2004). Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 292, 1724–1737.

Buchwald, H., Estok, R., Fahrbach, K., Banel, D., Jensen, M.D., Pories, W.J., Bantle, J.P., and Sledge, I. (2009). Weight and type 2 diabetes after bariatric surgery: systematic review and meta-analysis. *Am. J. Med.* 122, 248–256.e5.

Caesar, R., Reigstad, C.S., Bäckhed, H.K., Reinhardt, C., Ketonen, M., Lundén, G.Ö., Cani, P.D., and Bäckhed, F. (2012). Gut-derived lipopolysaccharide augments adipose macrophage accumulation but is not essential for impaired glucose or insulin tolerance in mice. *Gut* 61, 1701–1707.

Caesar, R., Tremaroli, V., Kovatcheva-Datchary, P., Cani, P.D., and Bäckhed, F. (2015). Crosstalk between Gut Microbiota and Dietary Lipids Aggravates WAT Inflammation through TLR Signaling. *Cell Metab.* 22, 658–668.

Calle, E.E., and Kaaks, R. (2004). Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* 4, 579–591.

Calle, E.E., Thun, M.J., Petrelli, J.M., Rodriguez, C., and Heath, C.W. (1999). Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. *N. Engl. J. Med.* 341, 1097–1105.

Cancello, R., Henegar, C., Viguerie, N., Taleb, S., Poitou, C., Rouault, C., Coupaye, M., Pelloux, V., Hugol, D., Bouillot, J.-L., et al. (2005). Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes* 54, 2277–2286.

Cani, P.D., Amar, J., Iglesias, M.A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Tuohy, K.M., Chabo, C., et al. (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56, 1761–1772.

Cani, P.D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A.M., Delzenne, N.M., and Burcelin, R. (2008). Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57, 1470–1481.

Cao, Y. (2010). Adipose tissue angiogenesis as a therapeutic target for obesity and metabolic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 107–115.

Carlsson, L.M.S., Peltonen, M., Ahlin, S., Anveden, Å., Bouchard, C., Carlsson, B., Jacobson, P., Lönroth, H., Maglio, C., Näslund, I., et al. (2012). Bariatric surgery and prevention of type 2 diabetes in Swedish obese subjects. *N. Engl. J. Med.* 367, 695–704.

Carnethon, M.R., De Chavez, P.J.D., Biggs, M.L., Lewis, C.E., Pankow, J.S., Bertoni, A.G., Golden, S.H., Liu, K., Mukamal, K.J., Campbell-Jenkins, B., et al. (2012). Association of weight status with mortality in adults with incident diabetes. *JAMA* 308, 581–590.



- Caspar-Bauguil, S., Cousin, B., Galinier, A., Segafredo, C., Nibbelink, M., André, M., Casteilla, L., and Pénicaud, L. (2005). Adipose tissues as an ancestral immune organ: site-specific change in obesity. *FEBS Lett.* 579, 3487–3492.
- Cavallari, J.F., Denou, E., Foley, K.P., Khan, W.I., and Schertzer, J.D. (2016). Different Th17 immunity in gut, liver, and adipose tissues during obesity: the role of diet, genetics, and microbes. *Gut Microbes* 7, 82–89.
- Chaput, J.-P., Brunet, M., and Tremblay, A. (2006). Relationship between short sleeping hours and childhood overweight/obesity: results from the “Québec en Forme” Project. *Int. J. Obes.* 2005 30, 1080–1085.
- Chavey, C., Lazennec, G., Lagarrigue, S., Clapé, C., Iankova, I., Teyssier, J., Annicotte, J.-S., Schmidt, J., Matak, C., Yamamoto, H., et al. (2009). CXC ligand 5 is an adipose-tissue derived factor that links obesity to insulin resistance. *Cell Metab.* 9, 339–349.
- Chen, B., Lam, K.S.L., Wang, Y., Wu, D., Lam, M.C., Shen, J., Wong, L., Hoo, R.L.C., Zhang, J., and Xu, A. (2006). Hypoxia dysregulates the production of adiponectin and plasminogen activator inhibitor-1 independent of reactive oxygen species in adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341, 549–556.
- Chen, H., He, Y.-W., Liu, W.-Q., and Zhang, J.-H. (2008). Rosiglitazone prevents murine hepatic fibrosis induced by *Schistosoma japonicum*. *World J. Gastroenterol.* 14, 2905–2911.
- Chen, Y., Tian, J., Tian, X., Tang, X., Rui, K., Tong, J., Lu, L., Xu, H., and Wang, S. (2014). Adipose tissue dendritic cells enhances inflammation by prompting the generation of Th17 cells. *PloS One* 9, e92450.
- Chien, Y., Meyer, C., and Bonneville, M. (2014).  $\gamma\delta$  T cells: first line of defense and beyond. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 121–155.
- Cho, K.W., Morris, D.L., DelProposto, J.L., Geletka, L., Zamarron, B., Martinez-Santibanez, G., Meyer, K.A., Singer, K., O'Rourke, R.W., and Lumeng, C.N. (2014). An MHC II-dependent activation loop between adipose tissue macrophages and CD4<sup>+</sup> T cells controls obesity-induced inflammation. *Cell Rep.* 9, 605–617.
- Chou, E., Suzuma, I., Way, K.J., Opland, D., Clermont, A.C., Naruse, K., Suzuma, K., Bowling, N.L., Vlahos, C.J., Aiello, L.P., et al. (2002). Decreased cardiac expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in insulin-resistant and diabetic States: a possible explanation for impaired collateral formation in cardiac tissue. *Circulation* 105, 373–379.
- Christakis, N.A., and Fowler, J.H. (2007). The spread of obesity in a large social network over 32 years. *N. Engl. J. Med.* 357, 370–379.
- Christiaens, V., and Lijnen, H.R. (2010). Angiogenesis and development of adipose tissue. *Mol. Cell. Endocrinol.* 318, 2–9.
- Chun, T.-H., Hotary, K.B., Sabeh, F., Saltiel, A.R., Allen, E.D., and Weiss, S.J. (2006). A pericellular collagenase directs the 3-dimensional development of white adipose tissue. *Cell* 125, 577–591.
- Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., Wang, S., Fortier, M., Greenberg, A.S., and Obin, M.S. (2005). Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J. Lipid Res.* 46, 2347–2355.

- Cipolletta, D. (2014). Adipose tissue-resident regulatory T cells: phenotypic specialization, functions and therapeutic potential. *Immunology* 142, 517–525.
- Cipolletta, D., Feuerer, M., Li, A., Kamei, N., Lee, J., Shoelson, S.E., Benoist, C., and Mathis, D. (2012). PPAR- $\gamma$  is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells. *Nature* 486, 549–553.
- Claffey, K.P., Wilkison, W.O., and Spiegelman, B.M. (1992). Vascular endothelial growth factor. Regulation by cell differentiation and activated second messenger pathways. *J. Biol. Chem.* 267, 16317–16322.
- Clément, K., Viguerie, N., Poitou, C., Carette, C., Pelloux, V., Curat, C.A., Sicard, A., Rome, S., Benis, A., Zucker, J.-D., et al. (2004). Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 18, 1657–1669.
- Colquitt, J., Clegg, A., Loveman, E., Royle, P., and Sidhu, M.K. (2005). Surgery for morbid obesity. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD003641.
- Colquitt, J.L., Pickett, K., Loveman, E., and Frampton, G.K. (2014). Surgery for weight loss in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* 8, CD003641.
- Combs, T.P., Berg, A.H., Obici, S., Scherer, P.E., and Rossetti, L. (2001). Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J. Clin. Invest.* 108, 1875–1881.
- Considine, R.V., Sinha, M.K., Heiman, M.L., Kriauciunas, A., Stephens, T.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Marco, C.C., McKee, L.J., and Bauer, T.L. (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.* 334, 292–295.
- Cook, K.S., Min, H.Y., Johnson, D., Chaplinsky, R.J., Flier, J.S., Hunt, C.R., and Spiegelman, B.M. (1987). Adipsin: a circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic nerve. *Science* 237, 402–405.
- Cooper, M.D. (2015). The early history of B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 191–197.
- Cornier, M.-A., Dabelea, D., Hernandez, T.L., Lindstrom, R.C., Steig, A.J., Stob, N.R., Van Pelt, R.E., Wang, H., and Eckel, R.H. (2008). The metabolic syndrome. *Endocr. Rev.* 29, 777–822.
- Costa, C., Incio, J., and Soares, R. (2007). Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? *Angiogenesis* 10, 149–166.
- Cotillard, A., Kennedy, S.P., Kong, L.C., Prifti, E., Pons, N., Le Chatelier, E., Almeida, M., Quinquis, B., Levenez, F., Galleron, N., et al. (2013). Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature* 500, 585–588.
- Cox, M.A., Harrington, L.E., and Zajac, A.J. (2011). Cytokines and the inception of CD8 T cell responses. *Trends Immunol.* 32, 180–186.
- Cristancho, A.G., and Lazar, M.A. (2011). Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 722–734.
- Curat, C.A., Miranville, A., Sengenès, C., Diehl, M., Tonus, C., Busse, R., and Bouloumié, A. (2004). From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes* 53, 1285–1292.

Czech, M.P. (2002). Fat targets for insulin signaling. *Mol. Cell* 9, 695–696.

Dalmas, E., Rouault, C., Abdenmour, M., Rovere, C., Rizkalla, S., Bar-Hen, A., Nahon, J.-L., Bouillot, J.-L., Guerre-Millo, M., Clément, K., et al. (2011a). Variations in circulating inflammatory factors are related to changes in calorie and carbohydrate intakes early in the course of surgery-induced weight reduction. *Am. J. Clin. Nutr.* 94, 450–458.

Dalmas, E., Clément, K., and Guerre-Millo, M. (2011b). Defining macrophage phenotype and function in adipose tissue. *Trends Immunol.* 32, 307–314.

Dalmas, E., Toubal, A., Alzaid, F., Blazek, K., Eames, H.L., Lebozec, K., Pini, M., Hainault, I., Montastier, E., Denis, R.G.P., et al. (2015). *Irf5* deficiency in macrophages promotes beneficial adipose tissue expansion and insulin sensitivity during obesity. *Nat. Med.* 21, 610–618.

Danesh, J., Whincup, P., Walker, M., Lennon, L., Thomson, A., Appleby, P., Gallimore, J.R., and Pepys, M.B. (2000). Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses. *BMJ* 321, 199–204.

Danesh, J., Wheeler, J.G., Hirschfield, G.M., Eda, S., Eiriksdottir, G., Rumley, A., Lowe, G.D.O., Pepys, M.B., and Gudnason, V. (2004). C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.* 350, 1387–1397.

Daniels, S.R., Arnett, D.K., Eckel, R.H., Gidding, S.S., Hayman, L.L., Kumanyika, S., Robinson, T.N., Scott, B.J., St Jeor, S., and Williams, C.L. (2005). Overweight in children and adolescents: pathophysiology, consequences, prevention, and treatment. *Circulation* 111, 1999–2012.

Davis, B.K., Wen, H., and Ting, J.P.-Y. (2011). The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 707–735.

Davoine, F., and Lacy, P. (2014). Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: emerging roles in immunity. *Front. Immunol.* 5, 570.

DeFuria, J., Belkina, A.C., Jagannathan-Bogdan, M., Snyder-Cappione, J., Carr, J.D., Nersesova, Y.R., Markham, D., Strissel, K.J., Watkins, A.A., Zhu, M., et al. (2013). B cells promote inflammation in obesity and type 2 diabetes through regulation of T-cell function and an inflammatory cytokine profile. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 5133–5138.

Deiuliis, J., Shah, Z., Shah, N., Needleman, B., Mikami, D., Narula, V., Perry, K., Hazey, J., Kampfrath, T., Kollengode, M., et al. (2011). Visceral adipose inflammation in obesity is associated with critical alterations in regulatory cell numbers. *PLoS One* 6, e16376.

Dejaco, C., Duftner, C., Grubeck-Loebenstien, B., and Schirmer, M. (2006). Imbalance of regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Immunology* 117, 289–300.

Deng, J., Liu, S., Zou, L., Xu, C., Geng, B., and Xu, G. (2012). Lipolysis response to endoplasmic reticulum stress in adipose cells. *J. Biol. Chem.* 287, 6240–6249.

Deng, T., Lyon, C.J., Minze, L.J., Lin, J., Zou, J., Liu, J.Z., Ren, Y., Yin, Z., Hamilton, D.J., Reardon, P.R., et al. (2013). Class II major histocompatibility complex plays an essential role in obesity-induced adipose inflammation. *Cell Metab.* 17, 411–422.

Deshmane, S.L., Kremlev, S., Amini, S., and Sawaya, B.E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* 29, 313–326.

Després, J.-P. (2012). Body fat distribution and risk of cardiovascular disease: an update. *Circulation* 126, 1301–1313.

Després, J.-P., and Lemieux, I. (2006). Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 444, 881–887.

Després, J.-P., Lemieux, I., Bergeron, J., Pibarot, P., Mathieu, P., Larose, E., Rodés-Cabau, J., Bertrand, O.F., and Poirier, P. (2008). Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 1039–1049.

Devaney, B., Kalb, L., Briefel, R., Zavitsky-Novak, T., Clusen, N., and Ziegler, P. (2004). Feeding infants and toddlers study: overview of the study design. *J. Am. Diet. Assoc.* 104, s8–s13.

Devèvre, E.F., Renovato-Martins, M., Clément, K., Sautès-Fridman, C., Cremer, I., and Poitou, C. (2015). Profiling of the three circulating monocyte subpopulations in human obesity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 194, 3917–3923.

Di Cesare, A., Di Meglio, P., and Nestle, F.O. (2009). The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 129, 1339–1350.

Dinarello, C.A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 519–550.

Dinarello, C.A., Marnoy, S.O., and Rosenwasser, L.J. (1983). Role of arachidonate metabolism in the immunoregulatory function of human leukocytic pyrogen/lymphocyte-activating factor/interleukin 1. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 130, 890–895.

Diraison, F., Dusserre, E., Vidal, H., Sothier, M., and Beylot, M. (2002). Increased hepatic lipogenesis but decreased expression of lipogenic gene in adipose tissue in human obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282, E46–E51.

Diraison, F., Yankah, V., Letexier, D., Dusserre, E., Jones, P., and Beylot, M. (2003). Differences in the regulation of adipose tissue and liver lipogenesis by carbohydrates in humans. *J. Lipid Res.* 44, 846–853.

Divoux, A., Tordjman, J., Lacasa, D., Veyrie, N., Hugol, D., Aissat, A., Basdevant, A., Guerre-Millo, M., Poitou, C., Zucker, J.-D., et al. (2010). Fibrosis in human adipose tissue: composition, distribution, and link with lipid metabolism and fat mass loss. *Diabetes* 59, 2817–2825.

Divoux, A., Moutel, S., Poitou, C., Lacasa, D., Veyrie, N., Aissat, A., Arock, M., Guerre-Millo, M., and Clément, K. (2012). Mast cells in human adipose tissue: link with morbid obesity, inflammatory status, and diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, E1677–E1685.

Domínguez, P.M., and Ardavín, C. (2010). Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation. *Immunol. Rev.* 234, 90–104.

Donath, M.Y., Dalmás, É., Sauter, N.S., and Böni-Schnetzler, M. (2013). Inflammation in obesity and diabetes: islet dysfunction and therapeutic opportunity. *Cell Metab.* 17, 860–872.

- Duffaut, C., Zakaroff-Girard, A., Bourlier, V., Decaunes, P., Maumus, M., Chiotasso, P., Sengenès, C., Lafontan, M., Galitzky, J., and Bouloumié, A. (2009a). Interplay between human adipocytes and T lymphocytes in obesity: CCL20 as an adipochemokine and T lymphocytes as lipogenic modulators. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 1608–1614.
- Duffaut, C., Galitzky, J., Lafontan, M., and Bouloumié, A. (2009b). Unexpected trafficking of immune cells within the adipose tissue during the onset of obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **384**, 482–485.
- Duncan, R.E., Ahmadian, M., Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E., and Sul, H.S. (2007). Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu. Rev. Nutr.* **27**, 79–101.
- Dusseaux, M., Martin, E., Serriari, N., Péguillet, I., Premel, V., Louis, D., Milder, M., Le Bourhis, L., Soudais, C., Treiner, E., et al. (2011). Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161hi IL-17-secreting T cells. *Blood* **117**, 1250–1259.
- Ekelund, U., Aman, J., Yngve, A., Renman, C., Westerterp, K., and Sjöström, M. (2002). Physical activity but not energy expenditure is reduced in obese adolescents: a case-control study. *Am. J. Clin. Nutr.* **76**, 935–941.
- Elgazar-Carmon, V., Rudich, A., Hadad, N., and Levy, R. (2008). Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. *J. Lipid Res.* **49**, 1894–1903.
- Elias, I., Franckhauser, S., Ferré, T., Vilà, L., Tafuro, S., Muñoz, S., Roca, C., Ramos, D., Pujol, A., Riu, E., et al. (2012). Adipose tissue overexpression of vascular endothelial growth factor protects against diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* **61**, 1801–1813.
- Eljaafari, A., Robert, M., Chehimi, M., Chanon, S., Durand, C., Vial, G., Bendridi, N., Madec, A.-M., Disse, E., Laville, M., et al. (2015). Adipose Tissue-Derived Stem Cells From Obese Subjects Contribute to Inflammation and Reduced Insulin Response in Adipocytes Through Differential Regulation of the Th1/Th17 Balance and Monocyte Activation. *Diabetes* **64**, 2477–2488.
- Erickson, G.R., Gimble, J.M., Franklin, D.M., Rice, H.E., Awad, H., and Guilak, F. (2002). Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**, 763–769.
- Estève, D., Boulet, N., Volat, F., Zakaroff-Girard, A., Ledoux, S., Coupaye, M., Decaunes, P., Belles, C., Gaits-Iacovoni, F., Iacovoni, J.S., et al. (2015). Human white and brite adipogenesis is supported by MSCA1 and is impaired by immune cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* **33**, 1277–1291.
- Fabbrini, E., Cella, M., McCartney, S.A., Fuchs, A., Abumrad, N.A., Pietka, T.A., Chen, Z., Finck, B.N., Han, D.H., Magkos, F., et al. (2013). Association between specific adipose tissue CD4+ T-cell populations and insulin resistance in obese individuals. *Gastroenterology* **145**, 366–374.e1–e3.
- Fain, J.N. (2010). Release of inflammatory mediators by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily by the nonfat cells: a review. *Mediators Inflamm.* **2010**, 513948.
- Fain, J.N., Madan, A.K., Hiler, M.L., Cheema, P., and Bahouth, S.W. (2004). Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* **145**, 2273–2282.
- Farmer, S.R. (2006). Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab.* **4**, 263–273.

- Feingold, K.R., and Grunfeld, C. (2000). Obesity and Dyslipidemia. In Endotext, L.J. De Groot, P. Beck-Peccoz, G. Chrousos, K. Dungan, A. Grossman, J.M. Hershman, C. Koch, R. McLachlan, M. New, R. Rebar, et al., eds. (South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.),.
- Feng, B., Jiao, P., Nie, Y., Kim, T., Jun, D., van Rooijen, N., Yang, Z., and Xu, H. (2011). Clodronate liposomes improve metabolic profile and reduce visceral adipose macrophage content in diet-induced obese mice. *PLoS One* 6, e24358.
- Ferlazzo, G., Thomas, D., Lin, S.-L., Goodman, K., Morandi, B., Muller, W.A., Moretta, A., and Münz, C. (2004). The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 172, 1455–1462.
- Ferrara, N., Gerber, H.-P., and LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* 9, 669–676.
- Feuerer, M., Herrero, L., Cipolletta, D., Naaz, A., Wong, J., Nayer, A., Lee, J., Goldfine, A.B., Benoist, C., Shoelson, S., et al. (2009). Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat. Med.* 15, 930–939.
- Finkelstein, E.A., Ruhm, C.J., and Kosa, K.M. (2005). Economic causes and consequences of obesity. *Annu. Rev. Public Health* 26, 239–257.
- Fischer, J.A.A., Hueber, A.J., Wilson, S., Galm, M., Baum, W., Kitson, C., Auer, J., Lorenz, S.H., Moelleken, J., Bader, M., et al. (2015). Combined inhibition of tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin-17 as a therapeutic opportunity in rheumatoid arthritis: development and characterization of a novel bispecific antibody. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* 67, 51–62.
- Fitzgerald, L.W., Burn, T.C., Brown, B.S., Patterson, J.P., Corjay, M.H., Valentine, P.A., Sun, J.H., Link, J.R., Abbaszade, I., Hollis, J.M., et al. (2000). Possible role of valvular serotonin 5-HT(2B) receptors in the cardiopathy associated with fenfluramine. *Mol. Pharmacol.* 57, 75–81.
- Fleischman, A., Shoelson, S.E., Bernier, R., and Goldfine, A.B. (2008). Salsalate improves glycemia and inflammatory parameters in obese young adults. *Diabetes Care* 31, 289–294.
- Fontaine, K.R., Redden, D.T., Wang, C., Westfall, A.O., and Allison, D.B. (2003). Years of life lost due to obesity. *JAMA* 289, 187–193.
- Font-Burgada, J., Sun, B., and Karin, M. (2016). Obesity and Cancer: The Oil that Feeds the Flame. *Cell Metab.* 23, 48–62.
- Frayn, K.N. (2002). Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia* 45, 1201–1210.
- Fried, S.K., Bunkin, D.A., and Greenberg, A.S. (1998). Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 847–850.
- Friedman, J.M., and Halaas, J.L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395, 763–770.
- Friedman, J.M., Leibel, R.L., Siegel, D.S., Walsh, J., and Bahary, N. (1991). Molecular mapping of the mouse ob mutation. *Genomics* 11, 1054–1062.

- Frühbeck, G. (2015). Bariatric and metabolic surgery: a shift in eligibility and success criteria. *Nat. Rev. Endocrinol.* *11*, 465–477.
- Fukui, M., Tanaka, M., Hamaguchi, M., Senmaru, T., Sakabe, K., Shiraishi, E., Harusato, I., Yamazaki, M., Hasegawa, G., and Nakamura, N. (2009). Eosinophil count is positively correlated with albumin excretion rate in men with type 2 diabetes. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* *4*, 1761–1765.
- Fukumura, D., Ushiyama, A., Duda, D.G., Xu, L., Tam, J., Krishna, V., Chatterjee, K., Garkavtsev, I., and Jain, R.K. (2003). Paracrine regulation of angiogenesis and adipocyte differentiation during in vivo adipogenesis. *Circ. Res.* *93*, e88–e97.
- Furuhashi, M., and Hotamisligil, G.S. (2008). Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* *7*, 489–503.
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., and Shimomura, I. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* *114*, 1752–1761.
- Galli, S.J., Kalesnikoff, J., Grimbaldston, M.A., Piliponsky, A.M., Williams, C.M.M., and Tsai, M. (2005). Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 749–786.
- Gao, D., and Bing, C. (2011). Macrophage-induced expression and release of matrix metalloproteinase 1 and 3 by human preadipocytes is mediated by IL-1 $\beta$  via activation of MAPK signaling. *J. Cell. Physiol.* *226*, 2869–2880.
- Gao, D., Madi, M., Ding, C., Fok, M., Steele, T., Ford, C., Hunter, L., and Bing, C. (2014). Interleukin-1 $\beta$  mediates macrophage-induced impairment of insulin signaling in human primary adipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *307*, E289–E304.
- Gao, Z., Hwang, D., Bataille, F., Lefevre, M., York, D., Quon, M.J., and Ye, J. (2002). Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. *J. Biol. Chem.* *277*, 48115–48121.
- Garidou, L., Pomié, C., Klopp, P., Waget, A., Charpentier, J., Aloulou, M., Giry, A., Serino, M., Stenman, L., Lahtinen, S., et al. (2015). The Gut Microbiota Regulates Intestinal CD4 T Cells Expressing ROR $\gamma$ t and Controls Metabolic Disease. *Cell Metab.* *22*, 100–112.
- Gatenby, R.A., and Gillies, R.J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer* *4*, 891–899.
- Gazit, R., Gruda, R., Elboim, M., Arnon, T.I., Katz, G., Achdout, H., Hanna, J., Qimron, U., Landau, G., Greenbaum, E., et al. (2006). Lethal influenza infection in the absence of the natural killer cell receptor gene Ncr1. *Nat. Immunol.* *7*, 517–523.
- Genser, L., Poitou, C., Brot-Laroche, É., Rousset, M., Vaillant, J.-C., Clément, K., Thenet, S., and Leturque, A. (2016). [Alteration of intestinal permeability: the missing link between gut microbiota modifications and inflammation in obesity?]. *Médecine Sci. MS* *32*, 461–469.
- Ghosh, G., Wang, V.Y.-F., Huang, D.-B., and Fusco, A. (2012). NF- $\kappa$ B regulation: lessons from structures. *Immunol. Rev.* *246*, 36–58.

- Giordano, A., Murano, I., Mondini, E., Perugini, J., Smorlesi, A., Severi, I., Barazzoni, R., Scherer, P.E., and Cinti, S. (2013). Obese adipocytes show ultrastructural features of stressed cells and die of pyroptosis. *J. Lipid Res.* *54*, 2423–2436.
- Girousse, A., Tavernier, G., Valle, C., Moro, C., Mejhert, N., Dinel, A.-L., Houssier, M., Roussel, B., Besse-Patin, A., Combes, M., et al. (2013). Partial inhibition of adipose tissue lipolysis improves glucose metabolism and insulin sensitivity without alteration of fat mass. *PLoS Biol.* *11*, e1001485.
- Godfrey, D.I., and Rossjohn, J. (2011). New ways to turn on NKT cells. *J. Exp. Med.* *208*, 1121–1125.
- Godfrey, D.I., MacDonald, H.R., Kronenberg, M., Smyth, M.J., and Van Kaer, L. (2004). NKT cells: what's in a name? *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 231–237.
- Goldfine, A.B., Silver, R., Aldhahi, W., Cai, D., Tatro, E., Lee, J., and Shoelson, S.E. (2008). Use of salsalate to target inflammation in the treatment of insulin resistance and type 2 diabetes. *Clin. Transl. Sci.* *1*, 36–43.
- Goldfine, A.B., Fonseca, V., Jablonski, K.A., Pyle, L., Staten, M.A., Shoelson, S.E., and TINSAL-T2D (Targeting Inflammation Using Salsalate in Type 2 Diabetes) Study Team (2010). The effects of salsalate on glycemic control in patients with type 2 diabetes: a randomized trial. *Ann. Intern. Med.* *152*, 346–357.
- Goldszmid, R.S., Caspar, P., Rivollier, A., White, S., Dzutsev, A., Hieny, S., Kelsall, B., Trinchieri, G., and Sher, A. (2012). NK cell-derived interferon- $\gamma$  orchestrates cellular dynamics and the differentiation of monocytes into dendritic cells at the site of infection. *Immunity* *36*, 1047–1059.
- Goossens, G.H., Bizzarri, A., Venticlef, N., Essers, Y., Cleutjens, J.P., Konings, E., Jocken, J.W.E., Cajlakovic, M., Ribitsch, V., Clément, K., et al. (2011). Increased adipose tissue oxygen tension in obese compared with lean men is accompanied by insulin resistance, impaired adipose tissue capillarization, and inflammation. *Circulation* *124*, 67–76.
- Gordon, S. (1995). The macrophage. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *17*, 977–986.
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 23–35.
- Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 953–964.
- Granneman, J.G., Li, P., Zhu, Z., and Lu, Y. (2005). Metabolic and cellular plasticity in white adipose tissue I: effects of beta3-adrenergic receptor activation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *289*, E608–E616.
- Green, H., and Kehinde, O. (1975). An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* *5*, 19–27.
- Gregoire, F.M., Smas, C.M., and Sul, H.S. (1998). Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* *78*, 783–809.
- Gregor, M.F., and Hotamisligil, G.S. (2007). Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J. Lipid Res.* *48*, 1905–1914.



- Gregor, M.F., Yang, L., Fabbrini, E., Mohammed, B.S., Eagon, J.C., Hotamisligil, G.S., and Klein, S. (2009). Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss. *Diabetes* 58, 693–700.
- Griffith, J.W., Sokol, C.L., and Luster, A.D. (2014). Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 659–702.
- Grosfeld, A., Andre, J., Hauguel-De Mouzon, S., Berra, E., Pouyssegur, J., and Guerre-Millo, M. (2002). Hypoxia-inducible factor 1 transactivates the human leptin gene promoter. *J. Biol. Chem.* 277, 42953–42957.
- Grunfeld, C., Zhao, C., Fuller, J., Pollack, A., Moser, A., Friedman, J., and Feingold, K.R. (1996). Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters. *J. Clin. Invest.* 97, 2152–2157.
- Gual, P., Le Marchand-Brustel, Y., and Tanti, J.-F. (2005). Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* 87, 99–109.
- Guerre-Millo, M., Grosfeld, A., and Issad, T. (2002). Leptin is a hypoxia-inducible gene. *Obes. Res.* 10, 856; author reply 857–858.
- Guh, D.P., Zhang, W., Bansback, N., Amarsi, Z., Birmingham, C.L., and Anis, A.H. (2009). The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health* 9, 88.
- Guigas, B., and Molofsky, A.B. (2015). A worm of one's own: how helminths modulate host adipose tissue function and metabolism. *Trends Parasitol.* 31, 435–441.
- Guilherme, A., Virbasius, J.V., Puri, V., and Czech, M.P. (2008). Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 367–377.
- Gur, C., Porgador, A., Elboim, M., Gazit, R., Mizrahi, S., Stern-Ginossar, N., Achdout, H., Ghadially, H., Dor, Y., Nir, T., et al. (2010). The activating receptor NKp46 is essential for the development of type 1 diabetes. *Nat. Immunol.* 11, 121–128.
- Hahn, P., and Novak, M. (1975). Development of brown and white adipose tissue. *J. Lipid Res.* 16, 79–91.
- Hajri, T., and Abumrad, N.A. (2002). Fatty acid transport across membranes: relevance to nutrition and metabolic pathology. *Annu. Rev. Nutr.* 22, 383–415.
- Halberg, N., Khan, T., Trujillo, M.E., Wernstedt-Asterholm, I., Attie, A.D., Sherwani, S., Wang, Z.V., Landskroner-Eiger, S., Dineen, S., Magalang, U.J., et al. (2009). Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue. *Mol. Cell. Biol.* 29, 4467–4483.
- Halvorsen, Y.D., Franklin, D., Bond, A.L., Hitt, D.C., Auchter, C., Boskey, A.L., Paschalis, E.P., Wilkison, W.O., and Gimble, J.M. (2001). Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng.* 7, 729–741.
- Hams, E., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., and Fallon, P.G. (2013). Cutting edge: IL-25 elicits innate lymphoid type 2 and type II NKT cells that regulate obesity in mice. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 191, 5349–5353.

- Han, M.S., Jung, D.Y., Morel, C., Lakhani, S.A., Kim, J.K., Flavell, R.A., and Davis, R.J. (2013). JNK expression by macrophages promotes obesity-induced insulin resistance and inflammation. *Science* 339, 218–222.
- Harman-Boehm, I., Blüher, M., Redel, H., Sion-Vardy, N., Ovadia, S., Avinoach, E., Shai, I., Klöting, N., Stumvoll, M., Bashan, N., et al. (2007). Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 2240–2247.
- Harty, J.T., and Badovinac, V.P. (2008). Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 107–119.
- Hashiguchi, M., Kashiwakura, Y., Kojima, H., Kobayashi, A., Kanno, Y., and Kobata, T. (2015). IL-33 activates eosinophils of visceral adipose tissue both directly and via innate lymphoid cells. *Eur. J. Immunol.* 45, 876–885.
- Hashimoto, D., Miller, J., and Merad, M. (2011). Dendritic cell and macrophage heterogeneity in vivo. *Immunity* 35, 323–335.
- Heal, D.J., Aspley, S., Prow, M.R., Jackson, H.C., Martin, K.F., and Cheetham, S.C. (1998). Sibutramine: a novel anti-obesity drug. A review of the pharmacological evidence to differentiate it from d-amphetamine and d-fenfluramine. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* 22 Suppl 1, S18–S28; discussion S29.
- Heini, A.F., and Weinsier, R.L. (1997). Divergent trends in obesity and fat intake patterns: the American paradox. *Am. J. Med.* 102, 259–264.
- Hill, J.O., and Peters, J.C. (1998). Environmental contributions to the obesity epidemic. *Science* 280, 1371–1374.
- Hill, A.A., Anderson-Baucum, E.K., Kennedy, A.J., Webb, C.D., Yull, F.E., and Hasty, A.H. (2015). Activation of NF- $\kappa$ B drives the enhanced survival of adipose tissue macrophages in an obesogenic environment. *Mol. Metab.* 4, 665–677.
- Hill, J.O., Wyatt, H.R., and Peters, J.C. (2012). Energy balance and obesity. *Circulation* 126, 126–132.
- Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Görgün, C.Z., Uysal, K.T., Maeda, K., Karin, M., and Hotamisligil, G.S. (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420, 333–336.
- Hirota, K., Yoshitomi, H., Hashimoto, M., Maeda, S., Teradaira, S., Sugimoto, N., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ito, H., Nakamura, T., et al. (2007). Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J. Exp. Med.* 204, 2803–2812.
- Hodson, L. (2014). Adipose tissue oxygenation: Effects on metabolic function. *Adipocyte* 3, 75–80.
- Hodson, L., Humphreys, S.M., Karpe, F., and Frayn, K.N. (2013). Metabolic signatures of human adipose tissue hypoxia in obesity. *Diabetes* 62, 1417–1425.
- Holland, W.L., Bikman, B.T., Wang, L.-P., Yuguang, G., Sargent, K.M., Bulchand, S., Knotts, T.A., Shui, G., Clegg, D.J., Wenk, M.R., et al. (2011). Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 1858–1870.

- Horowitz, J.F., and Klein, S. (2000). Whole body and abdominal lipolytic sensitivity to epinephrine is suppressed in upper body obese women. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 278, E1144–E1152.
- Hosogai, N., Fukuhara, A., Oshima, K., Miyata, Y., Tanaka, S., Segawa, K., Furukawa, S., Tochino, Y., Komuro, R., Matsuda, M., et al. (2007). Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes* 56, 901–911.
- Hotamisligil, G.S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444, 860–867.
- Hotamisligil, G.S. (2010). Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* 140, 900–917.
- Hotamisligil, G.S., and Erbay, E. (2008). Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 923–934.
- Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., and Spiegelman, B.M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87–91.
- Hu, E., Liang, P., and Spiegelman, B.M. (1996). AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J. Biol. Chem.* 271, 10697–10703.
- Hubbard, null, and Hall, null (1991). Gastrointestinal Surgery for Severe Obesity. *Obes. Surg.* 1, 257–265.
- Huber, J., Kiefer, F.W., Zeyda, M., Ludvik, B., Silberhumer, G.R., Prager, G., Zlabinger, G.J., and Stulnig, T.M. (2008). CC chemokine and CC chemokine receptor profiles in visceral and subcutaneous adipose tissue are altered in human obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 3215–3221.
- Hug, C., Wang, J., Ahmad, N.S., Bogan, J.S., Tsao, T.-S., and Lodish, H.F. (2004). T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 10308–10313.
- Hui, X., Gu, P., Zhang, J., Nie, T., Pan, Y., Wu, D., Feng, T., Zhong, C., Wang, Y., Lam, K.S.L., et al. (2015). Adiponectin Enhances Cold-Induced Browning of Subcutaneous Adipose Tissue via Promoting M2 Macrophage Proliferation. *Cell Metab.* 22, 279–290.
- Hundal, R.S., Petersen, K.F., Mayerson, A.B., Randhawa, P.S., Inzucchi, S., Shoelson, S.E., and Shulman, G.I. (2002). Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.* 109, 1321–1326.
- Hunter, G.R., Kekes-Szabo, T., Snyder, S.W., Nicholson, C., Nyikos, I., and Berland, L. (1997). Fat distribution, physical activity, and cardiovascular risk factors. *Med. Sci. Sports Exerc.* 29, 362–369.
- Ibrahimi, A., and Abumrad, N.A. (2002). Role of CD36 in membrane transport of long-chain fatty acids. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 5, 139–145.
- Ilan, Y., Maron, R., Tukpah, A.-M., Maioli, T.U., Murugaiyan, G., Yang, K., Wu, H.Y., and Weiner, H.L. (2010). Induction of regulatory T cells decreases adipose inflammation and alleviates insulin resistance in ob/ob mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 9765–9770.
- Imhof, B.A., and Aurrand-Lions, M. (2006). Angiogenesis and inflammation face off. *Nat. Med.* 12, 171–172.

- Irving, B.A., Davis, C.K., Brock, D.W., Weltman, J.Y., Swift, D., Barrett, E.J., Gaesser, G.A., and Weltman, A. (2008). Effect of exercise training intensity on abdominal visceral fat and body composition. *Med. Sci. Sports Exerc.* *40*, 1863–1872.
- Jaensson, E., Uronen-Hansson, H., Pabst, O., Eksteen, B., Tian, J., Coombes, J.L., Berg, P.-L., Davidsson, T., Powrie, F., Johansson-Lindbom, B., et al. (2008). Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *J. Exp. Med.* *205*, 2139–2149.
- Jaeschke, A., Czech, M.P., and Davis, R.J. (2004). An essential role of the JIP1 scaffold protein for JNK activation in adipose tissue. *Genes Dev.* *18*, 1976–1980.
- Jager, J., Grémeaux, T., Cormont, M., Le Marchand-Brustel, Y., and Tanti, J.-F. (2007). Interleukin-1 $\beta$ -induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology* *148*, 241–251.
- James, W.P.T., Caterson, I.D., Coutinho, W., Finer, N., Van Gaal, L.F., Maggioni, A.P., Torp-Pedersen, C., Sharma, A.M., Shepherd, G.M., Rode, R.A., et al. (2010). Effect of sibutramine on cardiovascular outcomes in overweight and obese subjects. *N. Engl. J. Med.* *363*, 905–917.
- Jernås, M., Palming, J., Sjöholm, K., Jennische, E., Svensson, P.-A., Gabrielsson, B.G., Levin, M., Sjögren, A., Rudemo, M., Lystig, T.C., et al. (2006). Separation of human adipocytes by size: hypertrophic fat cells display distinct gene expression. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *20*, 1540–1542.
- Ji, Y., Sun, S., Xu, A., Bhargava, P., Yang, L., Lam, K.S.L., Gao, B., Lee, C.-H., Kersten, S., and Qi, L. (2012a). Activation of natural killer T cells promotes M2 Macrophage polarization in adipose tissue and improves systemic glucose tolerance via interleukin-4 (IL-4)/STAT6 protein signaling axis in obesity. *J. Biol. Chem.* *287*, 13561–13571.
- Ji, Y., Sun, S., Xia, S., Yang, L., Li, X., and Qi, L. (2012b). Short term high fat diet challenge promotes alternative macrophage polarization in adipose tissue via natural killer T cells and interleukin-4. *J. Biol. Chem.* *287*, 24378–24386.
- Josefowicz, S.Z., Lu, L.-F., and Rudensky, A.Y. (2012). Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu. Rev. Immunol.* *30*, 531–564.
- Joshi, M.B., Philippova, M., Ivanov, D., Allenspach, R., Erne, P., and Resink, T.J. (2005). T-cadherin protects endothelial cells from oxidative stress-induced apoptosis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *19*, 1737–1739.
- Judge, T.A., and Cable, D.M. (2011). When it comes to pay, do the thin win? The effect of weight on pay for men and women. *J. Appl. Psychol.* *96*, 95–112.
- Kabon, B., Nagele, A., Reddy, D., Eagon, C., Fleshman, J.W., Sessler, D.I., and Kurz, A. (2004). Obesity decreases perioperative tissue oxygenation. *Anesthesiology* *100*, 274–280.
- Kadowaki, T., Yamauchi, T., Kubota, N., Hara, K., Ueki, K., and Tobe, K. (2006). Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* *116*, 1784–1792.
- Kaelin, W.G., and Ratcliffe, P.J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol. Cell* *30*, 393–402.

- Kahn, B.B., and Flier, J.S. (2000). Obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 106, 473–481.
- Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Miyachi, H., Maeda, S., Egashira, K., et al. (2006). MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Invest.* 116, 1494–1505.
- Kang, K., Reilly, S.M., Karabacak, V., Gangl, M.R., Fitzgerald, K., Hatano, B., and Lee, C.-H. (2008). Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPARdelta regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. *Cell Metab.* 7, 485–495.
- Kapsenberg, M.L. (2003). Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 984–993.
- Kawasaki, N., Asada, R., Saito, A., Kanemoto, S., and Imaizumi, K. (2012). Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue. *Sci. Rep.* 2, 799.
- Keophiphath, M., Achard, V., Henegar, C., Rouault, C., Clément, K., and Lacasa, D. (2009). Macrophage-secreted factors promote a profibrotic phenotype in human preadipocytes. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 23, 11–24.
- Keophiphath, M., Rouault, C., Divoux, A., Clément, K., and Lacasa, D. (2010). CCL5 promotes macrophage recruitment and survival in human adipose tissue. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 39–45.
- Kern, P.A., Di Gregorio, G.B., Lu, T., Rassouli, N., and Ranganathan, G. (2003). Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression. *Diabetes* 52, 1779–1785.
- Kershaw, E.E., and Flier, J.S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 2548–2556.
- Kersten, S. (2001). Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep.* 2, 282–286.
- Khan, M.T., Nieuwdorp, M., and Bäckhed, F. (2014). Microbial modulation of insulin sensitivity. *Cell Metab.* 20, 753–760.
- Khan, T., Muise, E.S., Iyengar, P., Wang, Z.V., Chandalia, M., Abate, N., Zhang, B.B., Bonaldo, P., Chua, S., and Scherer, P.E. (2009). Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. *Mol. Cell. Biol.* 29, 1575–1591.
- Kim, J.K., Kim, Y.J., Fillmore, J.J., Chen, Y., Moore, I., Lee, J., Yuan, M., Li, Z.W., Karin, M., Perret, P., et al. (2001). Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J. Clin. Invest.* 108, 437–446.
- Kintscher, U., Hartge, M., Hess, K., Foryst-Ludwig, A., Clemenz, M., Wabitsch, M., Fischer-Posovszky, P., Barth, T.F.E., Dragun, D., Skurk, T., et al. (2008). T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 1304–1310.
- Koch, U., and Radtke, F. (2011). Mechanisms of T cell development and transformation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 539–562.

- Kolonin, M.G., Saha, P.K., Chan, L., Pasqualini, R., and Arap, W. (2004). Reversal of obesity by targeted ablation of adipose tissue. *Nat. Med.* *10*, 625–632.
- Korn, T., and Petermann, F. (2012). Development and function of interleukin 17-producing  $\gamma\delta$  T cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1247*, 34–45.
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* *27*, 485–517.
- Kosteli, A., Sugaru, E., Haemmerle, G., Martin, J.F., Lei, J., Zechner, R., and Ferrante, A.W. (2010). Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. *J. Clin. Invest.* *120*, 3466–3479.
- Kotas, M.E., Lee, H.-Y., Gillum, M.P., Annicelli, C., Guigni, B.A., Shulman, G.I., and Medzhitov, R. (2011). Impact of CD1d deficiency on metabolism. *PloS One* *6*, e25478.
- van Kruijsdijk, R.C.M., van der Wall, E., and Visseren, F.L.J. (2009). Obesity and cancer: the role of dysfunctional adipose tissue. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* *18*, 2569–2578.
- Kubota, N., Terauchi, Y., Kubota, T., Kumagai, H., Itoh, S., Satoh, H., Yano, W., Ogata, H., Tokuyama, K., Takamoto, I., et al. (2006). Pioglitazone ameliorates insulin resistance and diabetes by both adiponectin-dependent and -independent pathways. *J. Biol. Chem.* *281*, 8748–8755.
- Kurki, E., Shi, J., Martonen, E., Finckenberg, P., and Mervaala, E. (2012). Distinct effects of calorie restriction on adipose tissue cytokine and angiogenesis profiles in obese and lean mice. *Nutr. Metab.* *9*, 64.
- Lacasa, D., Taleb, S., Keophiphath, M., Miranville, A., and Clement, K. (2007). Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of proinflammatory state in preadipocytes. *Endocrinology* *148*, 868–877.
- La Cava, A., and Matarese, G. (2004). The weight of leptin in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 371–379.
- Lafontan, M., and Langin, D. (2009). Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog. Lipid Res.* *48*, 275–297.
- Lagathu, C., Bastard, J.-P., Auclair, M., Maachi, M., Capeau, J., and Caron, M. (2003). Chronic interleukin-6 (IL-6) treatment increased IL-6 secretion and induced insulin resistance in adipocyte: prevention by rosiglitazone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *311*, 372–379.
- Lagathu, C., Yvan-Charvet, L., Bastard, J.-P., Maachi, M., Quignard-Boulangé, A., Capeau, J., and Caron, M. (2006). Long-term treatment with interleukin-1 $\beta$  induces insulin resistance in murine and human adipocytes. *Diabetologia* *49*, 2162–2173.
- Lanier, L.L. (2013). Shades of grey--the blurring view of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 73–74.
- Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2000). Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* *290*, 92–97.

- Laugerette, F., Vors, C., G  lo  n, A., Chauvin, M.-A., Soulage, C., Lambert-Porcheron, S., Peretti, N., Alligier, M., Burcelin, R., Laville, M., et al. (2011). Emulsified lipids increase endotoxemia: possible role in early postprandial low-grade inflammation. *J. Nutr. Biochem.* 22, 53–59.
- Laurence, A., and O’Shea, J.J. (2007). T(H)-17 differentiation: of mice and men. *Nat. Immunol.* 8, 903–905.
- Lawler, H.M., Underkofler, C.M., Kern, P.A., Erickson, C., Bredbeck, B., and Rasouli, N. (2016). Adipose Tissue Hypoxia, Inflammation, and Fibrosis in Obese Insulin-Sensitive and Obese Insulin-Resistant Subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101, 1422–1428.
- Lazo, M., and Clark, J.M. (2008). The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: a global perspective. *Semin. Liver Dis.* 28, 339–350.
- Leask, A., and Abraham, D.J. (2004). TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 18, 816–827.
- LeBien, T.W., and Tedder, T.F. (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 112, 1570–1580.
- Le Bourhis, L., Guerri, L., Dusseaux, M., Martin, E., Soudais, C., and Lantz, O. (2011). Mucosal-associated invariant T cells: unconventional development and function. *Trends Immunol.* 32, 212–218.
- Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., Almeida, M., Arumugam, M., Batto, J.-M., Kennedy, S., et al. (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 500, 541–546.
- Ledoux, S., Queguiner, I., Msika, S., Calderari, S., Rufat, P., Gasc, J.-M., Corvol, P., and Larger, E. (2008). Angiogenesis associated with visceral and subcutaneous adipose tissue in severe human obesity. *Diabetes* 57, 3247–3257.
- Lee, B.-C., Kim, M.-S., Pae, M., Yamamoto, Y., Eberl  , D., Shimada, T., Kamei, N., Park, H.-S., Sasorith, S., Woo, J.R., et al. (2016). Adipose Natural Killer Cells Regulate Adipose Tissue Macrophages to Promote Insulin Resistance in Obesity. *Cell Metab.* 23, 685–698.
- Lee, J.Y., Sohn, K.H., Rhee, S.H., and Hwang, D. (2001). Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* 276, 16683–16689.
- Lee, M.-W., Odegaard, J.I., Mukundan, L., Qiu, Y., Molofsky, A.B., Nussbaum, J.C., Yun, K., Locksley, R.M., and Chawla, A. (2015). Activated type 2 innate lymphoid cells regulate beige fat biogenesis. *Cell* 160, 74–87.
- Lee, Y.-H., Thacker, R.I., Hall, B.E., Kong, R., and Granneman, J.G. (2014a). Exploring the activated adipogenic niche: interactions of macrophages and adipocyte progenitors. *Cell Cycle Georget. Tex* 13, 184–190.
- Lee, Y.S., Kim, J., Osborne, O., Oh, D.Y., Sasik, R., Schenk, S., Chen, A., Chung, H., Murphy, A., Watkins, S.M., et al. (2014b). Increased adipocyte O2 consumption triggers HIF-1  , causing inflammation and insulin resistance in obesity. *Cell* 157, 1339–1352.

- Leeansyah, E., Loh, L., Nixon, D.F., and Sandberg, J.K. (2014). Acquisition of innate-like microbial reactivity in mucosal tissues during human fetal MAIT-cell development. *Nat. Commun.* 5, 3143.
- Lefterova, M.I., Zhang, Y., Steger, D.J., Schupp, M., Schug, J., Cristancho, A., Feng, D., Zhuo, D., Stoeckert, C.J., Liu, X.S., et al. (2008). PPARgamma and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. *Genes Dev.* 22, 2941–2952.
- Lehr, S., Hartwig, S., Lamers, D., Famulla, S., Müller, S., Hanisch, F.-G., Cuvelier, C., Ruige, J., Eckardt, K., Ouwens, D.M., et al. (2012). Identification and validation of novel adipokines released from primary human adipocytes. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 11, M111.010504.
- Ley, C.J., Lees, B., and Stevenson, J.C. (1992). Sex- and menopause-associated changes in body-fat distribution. *Am. J. Clin. Nutr.* 55, 950–954.
- Liekens, S., De Clercq, E., and Neyts, J. (2001). Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem. Pharmacol.* 61, 253–270.
- Lijnen, H.R. (2008). Angiogenesis and obesity. *Cardiovasc. Res.* 78, 286–293.
- Lillioja, S., Mott, D.M., Spraul, M., Ferraro, R., Foley, J.E., Ravussin, E., Knowler, W.C., Bennett, P.H., and Bogardus, C. (1993). Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians. *N. Engl. J. Med.* 329, 1988–1992.
- Lissner, L., Odell, P.M., D’Agostino, R.B., Stokes, J., Kreger, B.E., Belanger, A.J., and Brownell, K.D. (1991). Variability of body weight and health outcomes in the Framingham population. *N. Engl. J. Med.* 324, 1839–1844.
- Liu, J., Divoux, A., Sun, J., Zhang, J., Clément, K., Glickman, J.N., Sukhova, G.K., Wolters, P.J., Du, J., Gorgun, C.Z., et al. (2009). Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nat. Med.* 15, 940–945.
- Liu, Y., Aron-Wisnewsky, J., Marcelin, G., Genser, L., Le Naour, G., Torcivia, A., Bauvois, B., Bouchet, S., Pelloux, V., Sasso, M., et al. (2016). Accumulation and Changes in Composition of Collagens in Subcutaneous Adipose Tissue After Bariatric Surgery. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101, 293–304.
- Loebig, M., Klement, J., Schmoller, A., Betz, S., Heuck, N., Schweiger, U., Peters, A., Schultes, B., and Oltmanns, K.M. (2010). Evidence for a relationship between VEGF and BMI independent of insulin sensitivity by glucose clamp procedure in a homogenous group healthy young men. *PloS One* 5, e12610.
- Loftus, T.M., Jaworsky, D.E., Frehywot, G.L., Townsend, C.A., Ronnett, G.V., Lane, M.D., and Kuhajda, F.P. (2000). Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science* 288, 2379–2381.
- Lolmède, K., Durand de Saint Front, V., Galitzky, J., Lafontan, M., and Bouloumié, A. (2003). Effects of hypoxia on the expression of proangiogenic factors in differentiated 3T3-F442A adipocytes. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* 27, 1187–1195.
- López-Velázquez, J.A., Silva-Vidal, K.V., Ponciano-Rodríguez, G., Chávez-Tapia, N.C., Arrese, M., Uribe, M., and Méndez-Sánchez, N. (2014). The prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the Americas. *Ann. Hepatol.* 13, 166–178.



- Lord, G.M., Matarese, G., Howard, J.K., Baker, R.J., Bloom, S.R., and Lechler, R.I. (1998). Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 394, 897–901.
- Louis, S.N., Jackman, G.P., Nero, T.L., Iakovidis, D., and Louis, W.J. (2000). Role of beta-adrenergic receptor subtypes in lipolysis. *Cardiovasc. Drugs Ther. Spons. Int. Soc. Cardiovasc. Pharmacother.* 14, 565–577.
- Lowe, C.E., O’Rahilly, S., and Rochford, J.J. (2011). Adipogenesis at a glance. *J. Cell Sci.* 124, 2681–2686.
- de Luca, C., and Olefsky, J.M. (2008). Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett.* 582, 97–105.
- Luke, A., Rotimi, C.N., Adeyemo, A.A., Durazo-Arvizu, R.A., Prewitt, T.E., Moragne-Kayser, L., Harders, R., and Cooper, R.S. (2000). Comparability of resting energy expenditure in Nigerians and U.S. blacks. *Obes. Res.* 8, 351–359.
- Lumeng, C.N., Deyoung, S.M., Bodzin, J.L., and Saltiel, A.R. (2007a). Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes* 56, 16–23.
- Lumeng, C.N., Bodzin, J.L., and Saltiel, A.R. (2007b). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* 117, 175–184.
- Lynch, L., Nowak, M., Varghese, B., Clark, J., Hogan, A.E., Toxavidis, V., Balk, S.P., O’Shea, D., O’Farrelly, C., and Exley, M.A. (2012). Adipose tissue invariant NKT cells protect against diet-induced obesity and metabolic disorder through regulatory cytokine production. *Immunity* 37, 574–587.
- Maeda, N., Shimomura, I., Kishida, K., Nishizawa, H., Matsuda, M., Nagaretani, H., Furuyama, N., Kondo, H., Takahashi, M., Arita, Y., et al. (2002). Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat. Med.* 8, 731–737.
- Magalhaes, I., Pingris, K., Poitou, C., Bessoles, S., Venteclef, N., Kiaf, B., Beaudoin, L., Da Silva, J., Allatif, O., Rossjohn, J., et al. (2015a). Mucosal-associated invariant T cell alterations in obese and type 2 diabetic patients. *J. Clin. Invest.* 125, 1752–1762.
- Magalhaes, I., Kiaf, B., and Lehuen, A. (2015b). iNKT and MAIT Cell Alterations in Diabetes. *Front. Immunol.* 6, 341.
- Magkos, F., Fraterrigo, G., Yoshino, J., Luecking, C., Kirbach, K., Kelly, S.C., de Las Fuentes, L., He, S., Okunade, A.L., Patterson, B.W., et al. (2016). Effects of Moderate and Subsequent Progressive Weight Loss on Metabolic Function and Adipose Tissue Biology in Humans with Obesity. *Cell Metab.* 23, 591–601.
- Maldonado-López, R., De Smedt, T., Michel, P., Godfroid, J., Pajak, B., Heirman, C., Thielemans, K., Leo, O., Urbain, J., and Moser, M. (1999). CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J. Exp. Med.* 189, 587–592.
- Maldonado-López, R., Maliszewski, C., Urbain, J., and Moser, M. (2001). Cytokines regulate the capacity of CD8alpha(+) and CD8alpha(-) dendritic cells to prime Th1/Th2 cells in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 167, 4345–4350.
- Malhotra, J.D., and Kaufman, R.J. (2007). Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid. Redox Signal.* 9, 2277–2293.

- Malik, V.S., Willett, W.C., and Hu, F.B. (2013). Global obesity: trends, risk factors and policy implications. *Nat. Rev. Endocrinol.* 9, 13–27.
- Mangan, P.R., Harrington, L.E., O’Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., Elson, C.O., Hatton, R.D., Wahl, S.M., Schoeb, T.R., and Weaver, C.T. (2006). Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441, 231–234.
- Mann, T., Tomiyama, A.J., Westling, E., Lew, A.-M., Samuels, B., and Chatman, J. (2007). Medicare’s search for effective obesity treatments: diets are not the answer. *Am. Psychol.* 62, 220–233.
- Mantell, B.S., Stefanovic-Racic, M., Yang, X., Dedousis, N., Sipula, I.J., and O’Doherty, R.M. (2011). Mice lacking NKT cells but with a complete complement of CD8+ T-cells are not protected against the metabolic abnormalities of diet-induced obesity. *PloS One* 6, e19831.
- Mantovani, A., Cassatella, M.A., Costantini, C., and Jaillon, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 519–531.
- Maquoi, E., Munaut, C., Colige, A., Collen, D., and Lijnen, H.R. (2002). Modulation of adipose tissue expression of murine matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors with obesity. *Diabetes* 51, 1093–1101.
- Marseglia, L., Manti, S., D’Angelo, G., Nicotera, A., Parisi, E., Di Rosa, G., Gitto, E., and Arrigo, T. (2015). Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 378–400.
- Matzinger, P. (2002). An innate sense of danger. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 961, 341–342.
- Mauer, J., Denson, J.L., and Brünig, J.C. (2015). Versatile functions for IL-6 in metabolism and cancer. *Trends Immunol.* 36, 92–101.
- Mauri, C., and Bosma, A. (2012). Immune regulatory function of B cells. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 221–241.
- Maury, E., and Brichard, S.M. (2010). Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol. Cell. Endocrinol.* 314, 1–16.
- Mazurek, T., Zhang, L., Zalewski, A., Mannion, J.D., Diehl, J.T., Arafat, H., Sarov-Blat, L., O’Brien, S., Keiper, E.A., Johnson, A.G., et al. (2003). Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation* 108, 2460–2466.
- McAllister, E.J., Dhurandhar, N.V., Keith, S.W., Aronne, L.J., Barger, J., Baskin, M., Benca, R.M., Biggio, J., Boggiano, M.M., Eisenmann, J.C., et al. (2009). Ten putative contributors to the obesity epidemic. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 49, 868–913.
- McArdle, M.A., Finucane, O.M., Connaughton, R.M., McMorrow, A.M., and Roche, H.M. (2013). Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies. *Front. Endocrinol.* 4, 52.
- McDonnell, M.E., Ganley-Leal, L.M., Mehta, A., Bigornia, S.J., Mott, M., Rehman, Q., Farb, M.G., Hess, D.T., Joseph, L., Gokce, N., et al. (2012). B lymphocytes in human subcutaneous adipose crown-like structures. *Obes. Silver Spring Md* 20, 1372–1378.

- McGillicuddy, F.C., Chiquoine, E.H., Hinkle, C.C., Kim, R.J., Shah, R., Roche, H.M., Smyth, E.M., and Reilly, M.P. (2009). Interferon gamma attenuates insulin signaling, lipid storage, and differentiation in human adipocytes via activation of the JAK/STAT pathway. *J. Biol. Chem.* **284**, 31936–31944.
- McLaughlin, T., Liu, L.-F., Lamendola, C., Shen, L., Morton, J., Rivas, H., Winer, D., Tolentino, L., Choi, O., Zhang, H., et al. (2014). T-cell profile in adipose tissue is associated with insulin resistance and systemic inflammation in humans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**, 2637–2643.
- McNelis, J.C., and Olefsky, J.M. (2014). Macrophages, immunity, and metabolic disease. *Immunity* **41**, 36–48.
- Mehta, P., Nuotio-Antar, A.M., and Smith, C.W. (2015).  $\gamma\delta$  T cells promote inflammation and insulin resistance during high fat diet-induced obesity in mice. *J. Leukoc. Biol.* **97**, 121–134.
- Meijer, K., de Vries, M., Al-Lahham, S., Bruinenberg, M., Weening, D., Dijkstra, M., Kloosterhuis, N., van der Leij, R.J., van der Want, H., Kroesen, B.-J., et al. (2011). Human primary adipocytes exhibit immune cell function: adipocytes prime inflammation independent of macrophages. *PLoS One* **6**, e17154.
- Membrez, M., Blancher, F., Jaquet, M., Bibiloni, R., Cani, P.D., Burcelin, R.G., Corthesy, I., Macé, K., and Chou, C.J. (2008). Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **22**, 2416–2426.
- Mi, S., Li, Z., Yang, H.-Z., Liu, H., Wang, J.-P., Ma, Y.-G., Wang, X.-X., Liu, H.-Z., Sun, W., and Hu, Z.-W. (2011). Blocking IL-17A promotes the resolution of pulmonary inflammation and fibrosis via TGF- $\beta$ 1-dependent and -independent mechanisms. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **187**, 3003–3014.
- Minehira, K., Vega, N., Vidal, H., Acheson, K., and Tappy, L. (2004). Effect of carbohydrate overfeeding on whole body macronutrient metabolism and expression of lipogenic enzymes in adipose tissue of lean and overweight humans. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* **28**, 1291–1298.
- Miranville, A., Heeschen, C., Sengenès, C., Curat, C.A., Busse, R., and Bouloumié, A. (2004). Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* **110**, 349–355.
- Mitra, A., Luna, J.I., Marusina, A.I., Merleev, A., Kundu-Raychaudhuri, S., Fiorentino, D., Raychaudhuri, S.P., and Maverakis, E. (2015). Dual mTOR Inhibition Is Required to Prevent TGF- $\beta$ -Mediated Fibrosis: Implications for Scleroderma. *J. Invest. Dermatol.* **135**, 2873–2876.
- Mokdad, A.H., Ford, E.S., Bowman, B.A., Dietz, W.H., Vinicor, F., Bales, V.S., and Marks, J.S. (2003). Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *JAMA* **289**, 76–79.
- Mokdad, A.H., Marks, J.S., Stroup, D.F., and Gerberding, J.L. (2004). Actual causes of death in the United States, 2000. *JAMA* **291**, 1238–1245.
- Molofsky, A.B., Nussbaum, J.C., Liang, H.-E., Van Dyken, S.J., Cheng, L.E., Mohapatra, A., Chawla, A., and Locksley, R.M. (2013). Innate lymphoid type 2 cells sustain visceral adipose tissue eosinophils and alternatively activated macrophages. *J. Exp. Med.* **210**, 535–549.
- Molofsky, A.B., Van Gool, F., Liang, H.-E., Van Dyken, S.J., Nussbaum, J.C., Lee, J., Bluestone, J.A., and Locksley, R.M. (2015). Interleukin-33 and Interferon- $\gamma$  Counter-Regulate Group 2 Innate Lymphoid Cell Activation during Immune Perturbation. *Immunity* **43**, 161–174.

- Montani, J.-P., Vieceili, A.K., Prévot, A., and Dulloo, A.G. (2006). Weight cycling during growth and beyond as a risk factor for later cardiovascular diseases: the “repeated overshoot” theory. *Int. J. Obes.* 2005 30 Suppl 4, S58–S66.
- Monteiro-Sepulveda, M., Touch, S., Mendes-Sá, C., André, S., Poitou, C., Allatif, O., Cotillard, A., Fohrer-Ting, H., Hubert, E.-L., Remark, R., et al. (2015). Jejunal T Cell Inflammation in Human Obesity Correlates with Decreased Enterocyte Insulin Signaling. *Cell Metab.* 22, 113–124.
- Moore, C.J., and Cunningham, S.A. (2012). Social position, psychological stress, and obesity: a systematic review. *J. Acad. Nutr. Diet.* 112, 518–526.
- Moro, K., Yamada, T., Tanabe, M., Takeuchi, T., Ikawa, T., Kawamoto, H., Furusawa, J.-I., Ohtani, M., Fujii, H., and Koyasu, S. (2010). Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature* 463, 540–544.
- Morris, D.L., Cho, K.W., Delproposto, J.L., Oatmen, K.E., Geletka, L.M., Martinez-Santibanez, G., Singer, K., and Lumeng, C.N. (2013). Adipose tissue macrophages function as antigen-presenting cells and regulate adipose tissue CD4+ T cells in mice. *Diabetes* 62, 2762–2772.
- Morton, G.J., Cummings, D.E., Baskin, D.G., Barsh, G.S., and Schwartz, M.W. (2006). Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443, 289–295.
- Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 958–969.
- Mougiakakos, D., Choudhury, A., Lladser, A., Kiessling, R., and Johansson, C.C. (2010). Regulatory T cells in cancer. *Adv. Cancer Res.* 107, 57–117.
- Müller, G., Ertl, J., Gerl, M., and Preibisch, G. (1997). Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 272, 10585–10593.
- Müller-Stich, B.P., Senft, J.D., Warschkow, R., Kenngott, H.G., Billeter, A.T., Vit, G., Helfert, S., Diener, M.K., Fischer, L., Büchler, M.W., et al. (2015). Surgical versus medical treatment of type 2 diabetes mellitus in nonseverely obese patients: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Surg.* 261, 421–429.
- Muona, P., Jaakkola, S., Zhang, R.Z., Pan, T.C., Pelliniemi, L., Risteli, L., Chu, M.L., Uitto, J., and Peltonen, J. (1993). Hyperglycemic glucose concentrations up-regulate the expression of type VI collagen in vitro. Relevance to alterations of peripheral nerves in diabetes mellitus. *Am. J. Pathol.* 142, 1586–1597.
- Murray, C.J.L., Vos, T., Lozano, R., Naghavi, M., Flaxman, A.D., Michaud, C., Ezzati, M., Shibuya, K., Salomon, J.A., Abdalla, S., et al. (2012). Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet Lond. Engl.* 380, 2197–2223.
- Mutch, D.M., and Clément, K. (2006). Unraveling the genetics of human obesity. *PLoS Genet.* 2, e188.
- Nagareddy, P.R., Kraakman, M., Masters, S.L., Stirzaker, R.A., Gorman, D.J., Grant, R.W., Dragoljevic, D., Hong, E.S., Abdel-Latif, A., Smyth, S.S., et al. (2014). Adipose tissue macrophages promote myelopoiesis and monocytosis in obesity. *Cell Metab.* 19, 821–835.

- Nakamura, T., Sakata, R., Ueno, T., Sata, M., and Ueno, H. (2000). Inhibition of transforming growth factor beta prevents progression of liver fibrosis and enhances hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine-treated rats. *Hepatology*. Baltimore, Md 32, 247–255.
- Napolitano, L. (1963). THE DIFFERENTIATION OF WHITE ADIPOSE CELLS. AN ELECTRON MICROSCOPE STUDY. *J. Cell Biol.* 18, 663–679.
- Nara, N., Nakayama, Y., Okamoto, S., Tamura, H., Kiyono, M., Muraoka, M., Tanaka, K., Taya, C., Shitara, H., Ishii, R., et al. (2007). Disruption of CXC motif chemokine ligand-14 in mice ameliorates obesity-induced insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 282, 30794–30803.
- Nawrocki, A.R., Rajala, M.W., Tomas, E., Pajvani, U.B., Saha, A.K., Trumbauer, M.E., Pang, Z., Chen, A.S., Ruderman, N.B., Chen, H., et al. (2006). Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J. Biol. Chem.* 281, 2654–2660.
- Ngo, V.N., Cornall, R.J., and Cyster, J.G. (2001). Splenic T zone development is B cell dependent. *J. Exp. Med.* 194, 1649–1660.
- Nguyen, M.T.A., Satoh, H., Favelyukis, S., Babendure, J.L., Imamura, T., Sbodio, J.I., Zalevsky, J., Dahiyat, B.I., Chi, N.-W., and Olefsky, J.M. (2005). JNK and tumor necrosis factor-alpha mediate free fatty acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 280, 35361–35371.
- Nguyen, M.T.A., Favelyukis, S., Nguyen, A.-K., Reichart, D., Scott, P.A., Jenn, A., Liu-Bryan, R., Glass, C.K., Neels, J.G., and Olefsky, J.M. (2007). A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* 282, 35279–35292.
- Nielsen, T.S., Jessen, N., Jørgensen, J.O.L., Møller, N., and Lund, S. (2014). Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease. *J. Mol. Endocrinol.* 52, R199–R222.
- Nijhuis, J., Rensen, S.S., Slaats, Y., van Dielen, F.M.H., Buurman, W.A., and Greve, J.W.M. (2009). Neutrophil activation in morbid obesity, chronic activation of acute inflammation. *Obes. Silver Spring Md* 17, 2014–2018.
- Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Hosoya, Y., Yamashita, H., Fujita, H., Ohsugi, M., Tobe, K., Kadowaki, T., Nagai, R., et al. (2007). Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. *Diabetes* 56, 1517–1526.
- Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., Otsu, M., Hara, K., Ueki, K., Sugiura, S., et al. (2009). CD8<sup>+</sup> effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat. Med.* 15, 914–920.
- Noack, M., and Miossec, P. (2014). Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun. Rev.* 13, 668–677.
- Nomiyama, T., Perez-Tilve, D., Ogawa, D., Gizard, F., Zhao, Y., Heywood, E.B., Jones, K.L., Kawamori, R., Cassis, L.A., Tschöp, M.H., et al. (2007). Osteopontin mediates obesity-induced adipose tissue macrophage infiltration and insulin resistance in mice. *J. Clin. Invest.* 117, 2877–2888.
- O’Byrne, K.J., and Dalglish, A.G. (2001). Chronic immune activation and inflammation as the cause of malignancy. *Br. J. Cancer* 85, 473–483.

Odegaard, J.I., and Chawla, A. (2011). Alternative macrophage activation and metabolism. *Annu. Rev. Pathol.* 6, 275–297.

Odegaard, J.I., Ricardo-Gonzalez, R.R., Goforth, M.H., Morel, C.R., Subramanian, V., Mukundan, L., Red Eagle, A., Vats, D., Brombacher, F., Ferrante, A.W., et al. (2007). Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* 447, 1116–1120.

Odegaard, J.I., Ricardo-Gonzalez, R.R., Red Eagle, A., Vats, D., Morel, C.R., Goforth, M.H., Subramanian, V., Mukundan, L., Ferrante, A.W., and Chawla, A. (2008). Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab.* 7, 496–507.

Oeckinghaus, A., Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2011). Crosstalk in NF-κB signaling pathways. *Nat. Immunol.* 12, 695–708.

O'Hara, A., Lim, F.-L., Mazzatti, D.J., and Trayhurn, P. (2009). Microarray analysis identifies matrix metalloproteinases (MMPs) as key genes whose expression is up-regulated in human adipocytes by macrophage-conditioned medium. *Pflug. Arch. Eur. J. Physiol.* 458, 1103–1114.

Ohashi, K., Parker, J.L., Ouchi, N., Higuchi, A., Vita, J.A., Gokce, N., Pedersen, A.A., Kalthoff, C., Tullin, S., Sams, A., et al. (2010). Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. *J. Biol. Chem.* 285, 6153–6160.

Ohkawara, K., Tanaka, S., Miyachi, M., Ishikawa-Takata, K., and Tabata, I. (2007). A dose-response relation between aerobic exercise and visceral fat reduction: systematic review of clinical trials. *Int. J. Obes.* 2005 31, 1786–1797.

Ohmura, K., Ishimori, N., Ohmura, Y., Tokuhara, S., Nozawa, A., Horii, S., Andoh, Y., Fujii, S., Iwabuchi, K., Onoé, K., et al. (2010). Natural killer T cells are involved in adipose tissues inflammation and glucose intolerance in diet-induced obese mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 193–199.

Olshansky, S.J., Passaro, D.J., Hershow, R.C., Layden, J., Carnes, B.A., Brody, J., Hayflick, L., Butler, R.N., Allison, D.B., and Ludwig, D.S. (2005). A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century. *N. Engl. J. Med.* 352, 1138–1145.

Olsson, A.-K., Dimberg, A., Kreuger, J., and Claesson-Welsh, L. (2006). VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 359–371.

O'Rourke, R.W., Metcalf, M.D., White, A.E., Madala, A., Winters, B.R., Maizlin, I.I., Jobe, B.A., Roberts, C.T., Slifka, M.K., and Marks, D.L. (2009). Depot-specific differences in inflammatory mediators and a role for NK cells and IFN-gamma in inflammation in human adipose tissue. *Int. J. Obes.* 2005 33, 978–990.

O'Rourke, R.W., White, A.E., Metcalf, M.D., Olivas, A.S., Mitra, P., Larison, W.G., Cheang, E.C., Varlamov, O., Corless, C.L., Roberts, C.T., et al. (2011). Hypoxia-induced inflammatory cytokine secretion in human adipose tissue stromovascular cells. *Diabetologia* 54, 1480–1490.

O'Rourke, R.W., Gaston, G.D., Meyer, K.A., White, A.E., and Marks, D.L. (2013). Adipose tissue NK cells manifest an activated phenotype in human obesity. *Metabolism.* 62, 1557–1561.

O'Rourke, R.W., Meyer, K.A., Neeley, C.K., Gaston, G.D., Sekhri, P., Szumowski, M., Zamarron, B., Lumeng, C.N., and Marks, D.L. (2014). Systemic NK cell ablation attenuates intra-abdominal adipose tissue macrophage infiltration in murine obesity. *Obes. Silver Spring Md* 22, 2109–2114.

- Ouchi, N., Parker, J.L., Lugus, J.J., and Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 85–97.
- Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.-H., Iwakoshi, N.N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Görgün, C., Glimcher, L.H., and Hotamisligil, G.S. (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* *306*, 457–461.
- Padwal, R., Kezouh, A., Levine, M., and Etminan, M. (2007). Long-term persistence with orlistat and sibutramine in a population-based cohort. *Int. J. Obes.* *2005* *31*, 1567–1570.
- Pajvani, U.B., Trujillo, M.E., Combs, T.P., Iyengar, P., Jelicks, L., Roth, K.A., Kitsis, R.N., and Scherer, P.E. (2005). Fat apoptosis through targeted activation of caspase 8: a new mouse model of inducible and reversible lipoatrophy. *Nat. Med.* *11*, 797–803.
- Pandolfi, J.B., Ferraro, A.A., Sananez, I., Gancedo, M.C., Baz, P., Billordo, L.A., Fainboim, L., and Arruvito, L. (2016). ATP-Induced Inflammation Drives Tissue-Resident Th17 Cells in Metabolically Unhealthy Obesity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *196*, 3287–3296.
- Park, J., Morley, T.S., Kim, M., Clegg, D.J., and Scherer, P.E. (2014). Obesity and cancer--mechanisms underlying tumour progression and recurrence. *Nat. Rev. Endocrinol.* *10*, 455–465.
- Pasarica, M., Sereda, O.R., Redman, L.M., Albarado, D.C., Hymel, D.T., Roan, L.E., Rood, J.C., Burk, D.H., and Smith, S.R. (2009). Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. *Diabetes* *58*, 718–725.
- Patel, S.R., and Hu, F.B. (2008). Short sleep duration and weight gain: a systematic review. *Obes. Silver Spring Md* *16*, 643–653.
- Patsouris, D., Li, P.-P., Thapar, D., Chapman, J., Olefsky, J.M., and Neels, J.G. (2008). Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. *Cell Metab.* *8*, 301–309.
- Pellegrinelli, V., Rouault, C., Veyrie, N., Clément, K., and Lacasa, D. (2014a). Endothelial cells from visceral adipose tissue disrupt adipocyte functions in a three-dimensional setting: partial rescue by angiopoietin-1. *Diabetes* *63*, 535–549.
- Pellegrinelli, V., Heuvingh, J., du Roure, O., Rouault, C., Devulder, A., Klein, C., Lacasa, M., Clément, E., Lacasa, D., and Clément, K. (2014b). Human adipocyte function is impacted by mechanical cues. *J. Pathol.* *233*, 183–195.
- Pellegrinelli, V., Rouault, C., Rodriguez-Cuenca, S., Albert, V., Edom-Vovard, F., Vidal-Puig, A., Clément, K., Butler-Browne, G.S., and Lacasa, D. (2015). Human Adipocytes Induce Inflammation and Atrophy in Muscle Cells During Obesity. *Diabetes* *64*, 3121–3134.
- Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Baker, M.B., Hecht, R., Winters, D., Boone, T., and Collins, F. (1995). Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* *269*, 540–543.
- Pérez, C., Fernández-Galaz, C., Fernández-Agulló, T., Arribas, C., Andrés, A., Ros, M., and Carrascosa, J.M. (2004). Leptin impairs insulin signaling in rat adipocytes. *Diabetes* *53*, 347–353.

- Pezeshkian, M., Noori, M., Najjarpour-Jabbari, H., Abolfathi, A., Darabi, M., Darabi, M., Shaaker, M., and Shahmohammadi, G. (2009). Fatty acid composition of epicardial and subcutaneous human adipose tissue. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* 7, 125–131.
- Pham, C.T.N. (2006). Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 541–550.
- Pillay, J., den Braber, I., Vrisekoop, N., Kwast, L.M., de Boer, R.J., Borghans, J.A.M., Tesselaar, K., and Koenderman, L. (2010). In vivo labeling with  $^2\text{H}_2\text{O}$  reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 116, 625–627.
- Pinder, R.M., Brogden, R.N., Sawyer, P.R., Speight, T.M., and Avery, G.S. (1975). Fenfluramine: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in obesity. *Drugs* 10, 241–323.
- Pini, M., Touch, S., Poirier, H., Dalmas, E., Niot, I., Rouault, C., Druart, C., Delzenne, N., Clément, K., André, S., et al. (2016). Adipose tissue adaptive response to trans-10,cis-12-conjugated linoleic acid engages alternatively activated M2 macrophages. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 30, 241–251.
- Poggi, M., Bastelica, D., Gual, P., Iglesias, M.A., Gremeaux, T., Knauf, C., Peiretti, F., Verdier, M., Juhan-Vague, I., Tanti, J.F., et al. (2007). C3H/HeJ mice carrying a toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet. *Diabetologia* 50, 1267–1276.
- Pohlers, D., Brenmoehl, J., Löffler, I., Müller, C.K., Leipner, C., Schultze-Mosgau, S., Stallmach, A., Kinne, R.W., and Wolf, G. (2009). TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochim. Biophys. Acta* 1792, 746–756.
- Poitou, C., Lacorte, J.-M., Coupaye, M., Bertrais, S., Bedel, J.-F., Lafon, N., Bouillot, J.-L., Galan, P., Borson-Chazot, F., Basdevant, A., et al. (2005). Relationship between single nucleotide polymorphisms in leptin, IL6 and adiponectin genes and their circulating product in morbidly obese subjects before and after gastric banding surgery. *Obes. Surg.* 15, 11–23.
- Pories, W.J., Swanson, M.S., MacDonald, K.G., Long, S.B., Morris, P.G., Brown, B.M., Barakat, H.A., deRamon, R.A., Israel, G., and Dolezal, J.M. (1995). Who would have thought it? An operation proves to be the most effective therapy for adult-onset diabetes mellitus. *Ann. Surg.* 222, 339–350; discussion 350–352.
- Porter, S.A., Massaro, J.M., Hoffmann, U., Vasan, R.S., O'Donnel, C.J., and Fox, C.S. (2009). Abdominal subcutaneous adipose tissue: a protective fat depot? *Diabetes Care* 32, 1068–1075.
- Pradhan, A.D., Manson, J.E., Rifai, N., Buring, J.E., and Ridker, P.M. (2001). C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 286, 327–334.
- Preiss-Landl, K., Zimmermann, R., Hämmerle, G., and Zechner, R. (2002). Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 13, 471–481.
- Prieur, X., Mok, C.Y.L., Velagapudi, V.R., Núñez, V., Fuentes, L., Montaner, D., Ishikawa, K., Camacho, A., Barbarroja, N., O'Rahilly, S., et al. (2011). Differential lipid partitioning between adipocytes and tissue macrophages modulates macrophage lipotoxicity and M2/M1 polarization in obese mice. *Diabetes* 60, 797–809.



Prospective Studies Collaboration, Whitlock, G., Lewington, S., Sherliker, P., Clarke, R., Emberson, J., Halsey, J., Qizilbash, N., Collins, R., and Peto, R. (2009). Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet Lond. Engl.* 373, 1083–1096.

Pulendran, B., Smith, J.L., Caspary, G., Brasel, K., Pettit, D., Maraskovsky, E., and Maliszewski, C.R. (1999). Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 1036–1041.

Qiu, Y., Nguyen, K.D., Odegaard, J.I., Cui, X., Tian, X., Locksley, R.M., Palmiter, R.D., and Chawla, A. (2014). Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat. *Cell* 157, 1292–1308.

Qu, Y., Zhang, Q., Ma, S., Liu, S., Chen, Z., Mo, Z., and You, Z. (2016). Interleukin-17A Differentially Induces Inflammatory and Metabolic Gene Expression in the Adipose Tissues of Lean and Obese Mice. *Int. J. Mol. Sci.* 17.

Rahman, S.A., and Adjeroh, D. (2015). Surface-Based Body Shape Index and Its Relationship with All-Cause Mortality. *PloS One* 10, e0144639.

Ramkhalawon, B., Hennessy, E.J., Ménager, M., Ray, T.D., Sheedy, F.J., Hutchison, S., Wanschel, A., Oldebeken, S., Geoffrion, M., Spiro, W., et al. (2014). Netrin-1 promotes adipose tissue macrophage retention and insulin resistance in obesity. *Nat. Med.* 20, 377–384.

Ranganathan, S., Maffei, M., and Kern, P.A. (1998). Adipose tissue ob mRNA expression in humans: discordance with plasma leptin and relationship with adipose TNFalpha expression. *J. Lipid Res.* 39, 724–730.

Rao, R.R., Long, J.Z., White, J.P., Svensson, K.J., Lou, J., Lokurkar, I., Jedrychowski, M.P., Ruas, J.L., Wrann, C.D., Lo, J.C., et al. (2014). Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. *Cell* 157, 1279–1291.

Rausch, M.E., Weisberg, S., Vardhana, P., and Tortoriello, D.V. (2008). Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration. *Int. J. Obes.* 2005 32, 451–463.

Ravussin, E., Lillioja, S., Knowler, W.C., Christin, L., Freymond, D., Abbott, W.G., Boyce, V., Howard, B.V., and Bogardus, C. (1988). Reduced rate of energy expenditure as a risk factor for body-weight gain. *N. Engl. J. Med.* 318, 467–472.

Reggio, S., Rouault, C., Poitou, C., Bichet, J.-C., Prifti, E., Bouillot, J.-L., Rizkalla, S., Lacasa, D., Tordjman, J., and Clément, K. (2016). Increased basement membrane components in adipose tissue during obesity: links with TGFβ and metabolic phenotypes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* jc20154304.

Rehman, J., Considine, R.V., Bovenkerk, J.E., Li, J., Slavens, C.A., Jones, R.M., and March, K.L. (2003). Obesity is associated with increased levels of circulating hepatocyte growth factor. *J. Am. Coll. Cardiol.* 41, 1408–1413.

Rehman, J., Traktuev, D., Li, J., Merfeld-Clauss, S., Temm-Grove, C.J., Bovenkerk, J.E., Pell, C.L., Johnstone, B.H., Considine, R.V., and March, K.L. (2004). Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 109, 1292–1298.

- Rescigno, M. (2002). Dendritic cells and the complexity of microbial infection. *Trends Microbiol.* *10*, 425–461.
- Rexrode, K.M., Carey, V.J., Hennekens, C.H., Walters, E.E., Colditz, G.A., Stampfer, M.J., Willett, W.C., and Manson, J.E. (1998). Abdominal adiposity and coronary heart disease in women. *JAMA* *280*, 1843–1848.
- Ricardo-Gonzalez, R.R., Red Eagle, A., Odegaard, J.I., Jouihan, H., Morel, C.R., Heredia, J.E., Mukundan, L., Wu, D., Locksley, R.M., and Chawla, A. (2010). IL-4/STAT6 immune axis regulates peripheral nutrient metabolism and insulin sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 22617–22622.
- Ridker, P.M. (2004). High-sensitivity C-reactive protein, inflammation, and cardiovascular risk: from concept to clinical practice to clinical benefit. *Am. Heart J.* *148*, S19–S26.
- Roberts, R., Hodson, L., Dennis, A.L., Neville, M.J., Humphreys, S.M., Harnden, K.E., Micklem, K.J., and Frayn, K.N. (2009). Markers of de novo lipogenesis in adipose tissue: associations with small adipocytes and insulin sensitivity in humans. *Diabetologia* *52*, 882–890.
- Robinson, K., Prins, J., and Venkatesh, B. (2011). Clinical review: adiponectin biology and its role in inflammation and critical illness. *Crit. Care Lond. Engl.* *15*, 221.
- Rocha, S. (2007). Gene regulation under low oxygen: holding your breath for transcription. *Trends Biochem. Sci.* *32*, 389–397.
- Rocha, V.Z., Folco, E.J., Sukhova, G., Shimizu, K., Gotsman, I., Vernon, A.H., and Libby, P. (2008). Interferon-gamma, a Th1 cytokine, regulates fat inflammation: a role for adaptive immunity in obesity. *Circ. Res.* *103*, 467–476.
- Rodriguez, A.-M., Elabd, C., Amri, E.-Z., Ailhaud, G., and Dani, C. (2005). The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie* *87*, 125–128.
- Rose, D.P., Komninou, D., and Stephenson, G.D. (2004). Obesity, adipocytokines, and insulin resistance in breast cancer. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* *5*, 153–165.
- Rosen, E.D., Sarraf, P., Troy, A.E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D.S., Spiegelman, B.M., and Mortensen, R.M. (1999). PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol. Cell* *4*, 611–617.
- Rosen, E.D., Hsu, C.-H., Wang, X., Sakai, S., Freeman, M.W., Gonzalez, F.J., and Spiegelman, B.M. (2002). C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev.* *16*, 22–26.
- Rosenbaum, M., Knight, R., and Leibel, R.L. (2015). The gut microbiota in human energy homeostasis and obesity. *Trends Endocrinol. Metab.* *TEM* *26*, 493–501.
- Rosenberg, H.F., Dyer, K.D., and Foster, P.S. (2013). Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 9–22.
- Rotter, V., Nagaev, I., and Smith, U. (2003). Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J. Biol. Chem.* *278*, 45777–45784.

Rouault, C., Pellegrinelli, V., Schilch, R., Cotillard, A., Poitou, C., Tordjman, J., Sell, H., Clément, K., and Lacasa, D. (2013). Roles of chemokine ligand-2 (CXCL2) and neutrophils in influencing endothelial cell function and inflammation of human adipose tissue. *Endocrinology* 154, 1069–1079.

Roy, H., Bhardwaj, S., and Ylä-Herttuala, S. (2006). Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett.* 580, 2879–2887.

Ruan, H., and Lodish, H.F. (2003). Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Cytokine Growth Factor Rev.* 14, 447–455.

Rucker, D., Padwal, R., Li, S.K., Curioni, C., and Lau, D.C.W. (2007). Long term pharmacotherapy for obesity and overweight: updated meta-analysis. *BMJ* 335, 1194–1199.

Ruderman, N.B., Schneider, S.H., and Berchtold, P. (1981). The “metabolically-obese,” normal-weight individual. *Am. J. Clin. Nutr.* 34, 1617–1621.

Rupnick, M.A., Panigrahy, D., Zhang, C.-Y., Dallabrida, S.M., Lowell, B.B., Langer, R., and Folkman, M.J. (2002). Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 10730–10735.

Rutkowski, J.M., Stern, J.H., and Scherer, P.E. (2015). The cell biology of fat expansion. *J. Cell Biol.* 208, 501–512.

Saberi, M., Woods, N.-B., de Luca, C., Schenk, S., Lu, J.C., Bandyopadhyay, G., Verma, I.M., and Olefsky, J.M. (2009). Hematopoietic cell-specific deletion of toll-like receptor 4 ameliorates hepatic and adipose tissue insulin resistance in high-fat-fed mice. *Cell Metab.* 10, 419–429.

Sabio, G., Das, M., Mora, A., Zhang, Z., Jun, J.Y., Ko, H.J., Barrett, T., Kim, J.K., and Davis, R.J. (2008). A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science* 322, 1539–1543.

Salcedo, R., Wasserman, K., Young, H.A., Grimm, M.C., Howard, O.M., Anver, M.R., Kleinman, H.K., Murphy, W.J., and Oppenheim, J.J. (1999). Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: In vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1 $\alpha$ . *Am. J. Pathol.* 154, 1125–1135.

Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708–712.

Sallusto, F., Mackay, C.R., and Lanzavecchia, A. (2000). The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 593–620.

Sam, S., Haffner, S., Davidson, M.H., D’Agostino, R.B., Feinstein, S., Kondos, G., Perez, A., and Mazzone, T. (2009). Relation of abdominal fat depots to systemic markers of inflammation in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 32, 932–937.

Samaras, K., Kelly, P.J., Chiano, M.N., Spector, T.D., and Campbell, L.V. (1999). Genetic and environmental influences on total-body and central abdominal fat: the effect of physical activity in female twins. *Ann. Intern. Med.* 130, 873–882.

Samaras, K., Botelho, N.K., Chisholm, D.J., and Lord, R.V. (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue gene expression of serum adipokines that predict type 2 diabetes. *Obes. Silver Spring Md* 18, 884–889.

- Satoh, M., Andoh, Y., Clingan, C.S., Ogura, H., Fujii, S., Eshima, K., Nakayama, T., Taniguchi, M., Hirata, N., Ishimori, N., et al. (2012). Type II NKT cells stimulate diet-induced obesity by mediating adipose tissue inflammation, steatohepatitis and insulin resistance. *PLoS One* 7, e30568.
- Satriano, J. (2004). Arginine pathways and the inflammatory response: interregulation of nitric oxide and polyamines: review article. *Amino Acids* 26, 321–329.
- Schaffer, J.E. (2003). Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr. Opin. Lipidol.* 14, 281–287.
- Schenk, S., Saberi, M., and Olefsky, J.M. (2008). Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J. Clin. Invest.* 118, 2992–3002.
- Scherer, P.E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., and Lodish, H.F. (1995). A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 270, 26746–26749.
- Schipper, H.S., Rakhshandehroo, M., van de Graaf, S.F.J., Venken, K., Koppen, A., Stienstra, R., Prop, S., Meeding, J., Hamers, N., Besra, G., et al. (2012). Natural killer T cells in adipose tissue prevent insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 122, 3343–3354.
- Schoeller, D.A. (2001). The importance of clinical research: the role of thermogenesis in human obesity. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 511–516.
- Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Seeley, R.J., and Baskin, D.G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature* 404, 661–671.
- Sender, R., Fuchs, S., and Milo, R. (2016). Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *bioRxiv*.
- Sengenès, C., Lomède, K., Zakaroff-Girard, A., Busse, R., and Bouloumié, A. (2005). Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. *J. Cell. Physiol.* 205, 114–122.
- Serdula, M.K., Mokdad, A.H., Williamson, D.F., Galuska, D.A., Mendlein, J.M., and Heath, G.W. (1999). Prevalence of attempting weight loss and strategies for controlling weight. *JAMA* 282, 1353–1358.
- Shah, R., Hinkle, C.C., Ferguson, J.F., Mehta, N.N., Li, M., Qu, L., Lu, Y., Putt, M.E., Ahima, R.S., and Reilly, M.P. (2011). Fractalkine is a novel human adipochemokine associated with type 2 diabetes. *Diabetes* 60, 1512–1518.
- Shi, F.-D., Ljunggren, H.-G., La Cava, A., and Van Kaer, L. (2011). Organ-specific features of natural killer cells. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 658–671.
- Shi, H., Kokoeva, M.V., Inouye, K., Tzameli, I., Yin, H., and Flier, J.S. (2006). TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 116, 3015–3025.
- Shoelson, S.E. (2006). Banking on ATM as a new target in metabolic syndrome. *Cell Metab.* 4, 337–338.
- Silha, J.V., Krsek, M., Sucharda, P., and Murphy, L.J. (2005). Angiogenic factors are elevated in overweight and obese individuals. *Int. J. Obes.* 29, 1308–1314.

Silverman, K.J., Lund, D.P., Zetter, B.R., Lainey, L.L., Shahood, J.A., Freiman, D.G., Folkman, J., and Barger, A.C. (1988). Angiogenic activity of adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153, 347–352.

Singh, S.P., Zhang, H.H., Foley, J.F., Hedrick, M.N., and Farber, J.M. (2008). Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180, 214–221.

Sjöström, L., Lindroos, A.-K., Peltonen, M., Torgerson, J., Bouchard, C., Carlsson, B., Dahlgren, S., Larsson, B., Narbro, K., Sjöström, C.D., et al. (2004). Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. *N. Engl. J. Med.* 351, 2683–2693.

Sjöström, L., Narbro, K., Sjöström, C.D., Karason, K., Larsson, B., Wedel, H., Lystig, T., Sullivan, M., Bouchard, C., Carlsson, B., et al. (2007). Effects of bariatric surgery on mortality in Swedish obese subjects. *N. Engl. J. Med.* 357, 741–752.

Sjöström, L., Peltonen, M., Jacobson, P., Sjöström, C.D., Karason, K., Wedel, H., Ahlin, S., Anveden, Å., Bengtsson, C., Bergmark, G., et al. (2012). Bariatric surgery and long-term cardiovascular events. *JAMA* 307, 56–65.

Skurk, T., Alberti-Huber, C., Herder, C., and Hauner, H. (2007). Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 1023–1033.

Solinas, G., and Karin, M. (2010). JNK1 and IKKbeta: molecular links between obesity and metabolic dysfunction. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 24, 2596–2611.

Solinas, G., Vilcu, C., Neels, J.G., Bandyopadhyay, G.K., Luo, J.-L., Naugler, W., Grivennikov, S., Wynshaw-Boris, A., Scadeng, M., Olefsky, J.M., et al. (2007). JNK1 in hematopoietically derived cells contributes to diet-induced inflammation and insulin resistance without affecting obesity. *Cell Metab.* 6, 386–397.

Sopasakis, V.R., Sandqvist, M., Gustafson, B., Hammarstedt, A., Schmelz, M., Yang, X., Jansson, P.-A., and Smith, U. (2004). High local concentrations and effects on differentiation implicate interleukin-6 as a paracrine regulator. *Obes. Res.* 12, 454–460.

Spalding, K.L., Arner, E., Westermark, P.O., Bernard, S., Buchholz, B.A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Näslund, E., Britton, T., et al. (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453, 783–787.

Spencer, L.A., and Weller, P.F. (2010). Eosinophils and Th2 immunity: contemporary insights. *Immunol. Cell Biol.* 88, 250–256.

Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., et al. (2013). Innate lymphoid cells—a proposal for uniform nomenclature. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 145–149.

Stefanovic-Racic, M., Yang, X., Turner, M.S., Mantell, B.S., Stolz, D.B., Sumpter, T.L., Sipula, I.J., Dedousis, N., Scott, D.K., Morel, P.A., et al. (2012). Dendritic cells promote macrophage infiltration and comprise a substantial proportion of obesity-associated increases in CD11c<sup>+</sup> cells in adipose tissue and liver. *Diabetes* 61, 2330–2339.

Stephens, J.M., Lee, J., and Pilch, P.F. (1997). Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. *J. Biol. Chem.* 272, 971–976.

Stienstra, R., van Diepen, J.A., Tack, C.J., Zaki, M.H., van de Veerdonk, F.L., Perera, D., Neale, G.A., Hooiveld, G.J., Hijmans, A., Vroegrijk, I., et al. (2011a). Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 15324–15329.

Stienstra, R., van Diepen, J.A., Tack, C.J., Zaki, M.H., van de Veerdonk, F.L., Perera, D., Neale, G.A., Hooiveld, G.J., Hijmans, A., Vroegrijk, I., et al. (2011b). Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 15324–15329.

Stone, K.D., Prussin, C., and Metcalfe, D.D. (2010). IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S73–S80.

Strissel, K.J., Stancheva, Z., Miyoshi, H., Perfield, J.W., DeFuria, J., Jick, Z., Greenberg, A.S., and Obin, M.S. (2007). Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes* 56, 2910–2918.

Strissel, K.J., DeFuria, J., Shaul, M.E., Bennett, G., Greenberg, A.S., and Obin, M.S. (2010). T-cell recruitment and Th1 polarization in adipose tissue during diet-induced obesity in C57BL/6 mice. *Obes. Silver Spring Md* 18, 1918–1925.

Strowig, T., Henao-Mejia, J., Elinav, E., and Flavell, R. (2012). Inflammasomes in health and disease. *Nature* 481, 278–286.

Suganami, T., Nishida, J., and Ogawa, Y. (2005). A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 2062–2068.

Sumithran, P., Prendergast, L.A., Delbridge, E., Purcell, K., Shulkes, A., Kriketos, A., and Proietto, J. (2011). Long-term persistence of hormonal adaptations to weight loss. *N. Engl. J. Med.* 365, 1597–1604.

Sun, K., Kusminski, C.M., and Scherer, P.E. (2011). Adipose tissue remodeling and obesity. *J. Clin. Invest.* 121, 2094–2101.

Sun, K., Wernstedt Asterholm, I., Kusminski, C.M., Bueno, A.C., Wang, Z.V., Pollard, J.W., Brekken, R.A., and Scherer, P.E. (2012). Dichotomous effects of VEGF-A on adipose tissue dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 5874–5879.

Sun, K., Tordjman, J., Clément, K., and Scherer, P.E. (2013). Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell Metab.* 18, 470–477.

Takaoka, M., Nagata, D., Kihara, S., Shimomura, I., Kimura, Y., Tabata, Y., Saito, Y., Nagai, R., and Sata, M. (2009). Periadventitial adipose tissue plays a critical role in vascular remodeling. *Circ. Res.* 105, 906–911.

Takeuchi, T., Adachi, Y., Ohtsuki, Y., and Furihata, M. (2007). Adiponectin receptors, with special focus on the role of the third receptor, T-cadherin, in vascular disease. *Med. Mol. Morphol.* 40, 115–120.

- Talukdar, S., Oh, D.Y., Bandyopadhyay, G., Li, D., Xu, J., McNelis, J., Lu, M., Li, P., Yan, Q., Zhu, Y., et al. (2012). Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nat. Med.* *18*, 1407–1412.
- Tam, J., Duda, D.G., Perentes, J.Y., Quadri, R.S., Fukumura, D., and Jain, R.K. (2009). Blockade of VEGFR2 and not VEGFR1 can limit diet-induced fat tissue expansion: role of local versus bone marrow-derived endothelial cells. *PLoS One* *4*, e4974.
- Tang, Q.Q., and Lane, M.D. (2012). Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu. Rev. Biochem.* *81*, 715–736.
- Tanti, J.-F., and Jager, J. (2009). Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Curr. Opin. Pharmacol.* *9*, 753–762.
- Teekakirikul, P., Eminaga, S., Toka, O., Alcalai, R., Wang, L., Wakimoto, H., Naylor, M., Konno, T., Gorham, J.M., Wolf, C.M., et al. (2010). Cardiac fibrosis in mice with hypertrophic cardiomyopathy is mediated by non-myocyte proliferation and requires Tgf- $\beta$ . *J. Clin. Invest.* *120*, 3520–3529.
- Teng, X., Li, D., Catravas, J.D., and Johns, R.A. (2002). C/EBP-beta mediates iNOS induction by hypoxia in rat pulmonary microvascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* *90*, 125–127.
- Thangarajah, H., Yao, D., Chang, E.I., Shi, Y., Jazayeri, L., Vial, I.N., Galiano, R.D., Du, X.-L., Grogan, R., Galvez, M.G., et al. (2009). The molecular basis for impaired hypoxia-induced VEGF expression in diabetic tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 13505–13510.
- Tilg, H., and Moschen, A.R. (2010). Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* *52*, 1836–1846.
- Tinahones, F.J., Coín-Aragüez, L., Mayas, M.D., Garcia-Fuentes, E., Hurtado-Del-Pozo, C., Vendrell, J., Cardona, F., Calvo, R.-M., Obregon, M.-J., and El Bekay, R. (2012). Obesity-associated insulin resistance is correlated to adipose tissue vascular endothelial growth factors and metalloproteinase levels. *BMC Physiol.* *12*, 4.
- Tohyama, M., Hanakawa, Y., Shirakata, Y., Dai, X., Yang, L., Hirakawa, S., Tokumaru, S., Okazaki, H., Sayama, K., and Hashimoto, K. (2009). IL-17 and IL-22 mediate IL-20 subfamily cytokine production in cultured keratinocytes via increased IL-22 receptor expression. *Eur. J. Immunol.* *39*, 2779–2788.
- Tontonoz, P., Hu, E., and Spiegelman, B.M. (1994). Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* *79*, 1147–1156.
- Torgerson, J.S., Hauptman, J., Boldrin, M.N., and Sjöström, L. (2004). XENical in the prevention of diabetes in obese subjects (XENDOS) study: a randomized study of orlistat as an adjunct to lifestyle changes for the prevention of type 2 diabetes in obese patients. *Diabetes Care* *27*, 155–161.
- Torres, S.J., and Nowson, C.A. (2007). Relationship between stress, eating behavior, and obesity. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* *23*, 887–894.
- Tourniaire, F., Romier-Crouzet, B., Lee, J.H., Marcotorchino, J., Gouranton, E., Salles, J., Malezet, C., Astier, J., Darmon, P., Blouin, E., et al. (2013). Chemokine Expression in Inflamed Adipose Tissue Is Mainly Mediated by NF- $\kappa$ B. *PLoS One* *8*, e66515.
- Trayhurn, P. (2005). Adipose tissue in obesity--an inflammatory issue. *Endocrinology* *146*, 1003–1005.

- Trayhurn, P., and Wood, I.S. (2004). Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br. J. Nutr.* 92, 347–355.
- Treiner, E., Duban, L., Bahram, S., Radosavljevic, M., Wanner, V., Tilloy, F., Affaticati, P., Gilfillan, S., and Lantz, O. (2003). Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature* 422, 164–169.
- Tsuchida, A., Yamauchi, T., Ito, Y., Hada, Y., Maki, T., Takekawa, S., Kamon, J., Kobayashi, M., Suzuki, R., Hara, K., et al. (2004). Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *J. Biol. Chem.* 279, 30817–30822.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., and Gordon, J.I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027–1031.
- Turnbaugh, P.J., Bäckhed, F., Fulton, L., and Gordon, J.I. (2008). Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe* 3, 213–223.
- Turnbaugh, P.J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B.L., Duncan, A., Ley, R.E., Sogin, M.L., Jones, W.J., Roe, B.A., Affourtit, J.P., et al. (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457, 480–484.
- Ueno, H., Palucka, A.K., and Banchereau, J. (2010). The expanding family of dendritic cell subsets. *Nat. Biotechnol.* 28, 813–815.
- Unger, R.H., and Scherer, P.E. (2010). Gluttony, sloth and the metabolic syndrome: a roadmap to lipotoxicity. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 21, 345–352.
- Ussher, J.E., Klenerman, P., and Willberg, C.B. (2014). Mucosal-associated invariant T-cells: new players in anti-bacterial immunity. *Front. Immunol.* 5, 450.
- Vague, J. (1947). [Not Available]. *Presse Médicale* 55, 339.
- Vallerie, S.N., Furuhashi, M., Fucho, R., and Hotamisligil, G.S. (2008). A predominant role for parenchymal c-Jun amino terminal kinase (JNK) in the regulation of systemic insulin sensitivity. *PLoS One* 3, e3151.
- Vandanmagsar, B., Youm, Y.-H., Ravussin, A., Galgani, J.E., Stadler, K., Mynatt, R.L., Ravussin, E., Stephens, J.M., and Dixit, V.D. (2011). The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat. Med.* 17, 179–188.
- Vantourout, P., and Hayday, A. (2013). Six-of-the-best: unique contributions of  $\gamma\delta$  T cells to immunology. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 88–100.
- Vieira-Potter, V.J. (2014). Inflammation and macrophage modulation in adipose tissues. *Cell. Microbiol.* 16, 1484–1492.
- Viel, S., Besson, L., Charrier, E., Marçais, A., Disse, E., Bienvenu, J., Walzer, T., and Dumontet, C. (2016). Alteration of Natural Killer cell phenotype and function in obese individuals. *Clin. Immunol.* Orlando Fla.
- Vignali, D.A.A., Collison, L.W., and Workman, C.J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 523–532.



- Vijan, S. (2015). Type 2 diabetes. *Ann. Intern. Med.* 163, 322.
- Vila, I.K., Badin, P.-M., Marques, M.-A., Monbrun, L., Lefort, C., Mir, L., Louche, K., Bourlier, V., Roussel, B., Gui, P., et al. (2014). Immune cell Toll-like receptor 4 mediates the development of obesity- and endotoxemia-associated adipose tissue fibrosis. *Cell Rep.* 7, 1116–1129.
- Villaret, A., Galitzky, J., Decaunes, P., Estève, D., Marques, M.-A., Sengenès, C., Chiotasso, P., Tchkonja, T., Lafontan, M., Kirkland, J.L., et al. (2010). Adipose tissue endothelial cells from obese human subjects: differences among depots in angiogenic, metabolic, and inflammatory gene expression and cellular senescence. *Diabetes* 59, 2755–2763.
- Virtanen, K.A., Lönnroth, P., Parkkola, R., Peltoniemi, P., Asola, M., Viljanen, T., Tolvanen, T., Knuuti, J., Rönkämaa, T., Huupponen, R., et al. (2002). Glucose uptake and perfusion in subcutaneous and visceral adipose tissue during insulin stimulation in nonobese and obese humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 3902–3910.
- Vita, A.J., Terry, R.B., Hubert, H.B., and Fries, J.F. (1998). Aging, health risks, and cumulative disability. *N. Engl. J. Med.* 338, 1035–1041.
- Vivier, E., Raulet, D.H., Moretta, A., Caligiuri, M.A., Zitvogel, L., Lanier, L.L., Yokoyama, W.M., and Ugolini, S. (2011). Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 331, 44–49.
- Voehringer, D. (2013). Protective and pathological roles of mast cells and basophils. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 362–375.
- Vona-Davis, L., and Rose, D.P. (2009). Angiogenesis, adipokines and breast cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 20, 193–201.
- Walker, J.A., Barlow, J.L., and McKenzie, A.N.J. (2013). Innate lymphoid cells--how did we miss them? *Nat. Rev. Immunol.* 13, 75–87.
- Wang, H., and Eckel, R.H. (2009). Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297, E271–E288.
- Wang, J., Vanegas, S.M., Du, X., Noble, T., Zingg, J.-M.A., Meydani, M., Meydani, S.N., and Wu, D. (2013a). Caloric restriction favorably impacts metabolic and immune/inflammatory profiles in obese mice but curcumin/piperine consumption adds no further benefit. *Nutr. Metab.* 10, 29.
- Wang, M.Y., Lee, Y., and Unger, R.H. (1999). Novel form of lipolysis induced by leptin. *J. Biol. Chem.* 274, 17541–17544.
- Wang, Q.A., Tao, C., Gupta, R.K., and Scherer, P.E. (2013b). Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat. Med.* 19, 1338–1344.
- Wang, X., Ota, N., Manzanillo, P., Kates, L., Zavala-Solorio, J., Eidenschenk, C., Zhang, J., Lesch, J., Lee, W.P., Ross, J., et al. (2014). Interleukin-22 alleviates metabolic disorders and restores mucosal immunity in diabetes. *Nature* 514, 237–241.
- Wang, Z., Yang, L., Jiang, Y., Ling, Z.-Q., Li, Z., Cheng, Y., Huang, H., Wang, L., Pan, Y., Wang, Z., et al. (2011). High fat diet induces formation of spontaneous liposarcoma in mouse adipose tissue with overexpression of interleukin 22. *PLoS One* 6, e23737.

- Wardle, J., and Cooke, L. (2005). The impact of obesity on psychological well-being. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* *19*, 421–440.
- Watt, M.J., Hevener, A., Lancaster, G.I., and Febbraio, M.A. (2006). Ciliary neurotrophic factor prevents acute lipid-induced insulin resistance by attenuating ceramide accumulation and phosphorylation of c-Jun N-terminal kinase in peripheral tissues. *Endocrinology* *147*, 2077–2085.
- Weber, A., Wasiliew, P., and Kracht, M. (2010). Interleukin-1beta (IL-1beta) processing pathway. *Sci. Signal.* *3*, cm2.
- Weinsier, R.L., Hunter, G.R., Heini, A.F., Goran, M.I., and Sell, S.M. (1998). The etiology of obesity: relative contribution of metabolic factors, diet, and physical activity. *Am. J. Med.* *105*, 145–150.
- Weinsier, R.L., Hunter, G.R., Desmond, R.A., Byrne, N.M., Zuckerman, P.A., and Darnell, B.E. (2002). Free-living activity energy expenditure in women successful and unsuccessful at maintaining a normal body weight. *Am. J. Clin. Nutr.* *75*, 499–504.
- Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* *112*, 1796–1808.
- Weisberg, S.P., Hunter, D., Huber, R., Lemieux, J., Slaymaker, S., Vaddi, K., Charo, I., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W. (2006). CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J. Clin. Invest.* *116*, 115–124.
- Wellen, K.E., and Hotamisligil, G.S. (2003). Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* *112*, 1785–1788.
- Wellen, K.E., Fucho, R., Gregor, M.F., Furuhashi, M., Morgan, C., Lindstad, T., Vaillancourt, E., Gorgun, C.Z., Saatcioglu, F., and Hotamisligil, G.S. (2007). Coordinated regulation of nutrient and inflammatory responses by STAMP2 is essential for metabolic homeostasis. *Cell* *129*, 537–548.
- Welti, J., Loges, S., Dimmeler, S., and Carmeliet, P. (2013). Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J. Clin. Invest.* *123*, 3190–3200.
- Wen, H., Gris, D., Lei, Y., Jha, S., Zhang, L., Huang, M.T.-H., Brickey, W.J., and Ting, J.P.-Y. (2011). Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat. Immunol.* *12*, 408–415.
- Wensveen, F.M., Jelenčić, V., Valentić, S., Šestan, M., Wensveen, T.T., Theurich, S., Glasner, A., Mendrila, D., Štimac, D., Wunderlich, F.T., et al. (2015). NK cells link obesity-induced adipose stress to inflammation and insulin resistance. *Nat. Immunol.* *16*, 376–385.
- Whitehead, J.P., Richards, A.A., Hickman, I.J., Macdonald, G.A., and Prins, J.B. (2006). Adiponectin--a key adipokine in the metabolic syndrome. *Diabetes Obes. Metab.* *8*, 264–280.
- Wildman, R.P., Muntner, P., Reynolds, K., McGinn, A.P., Rajpathak, S., Wylie-Rosett, J., and Sowers, M.R. (2008). The obese without cardiometabolic risk factor clustering and the normal weight with cardiometabolic risk factor clustering: prevalence and correlates of 2 phenotypes among the US population (NHANES 1999-2004). *Arch. Intern. Med.* *168*, 1617–1624.

- Williamson, D.F., Madans, J., Anda, R.F., Kleinman, J.C., Kahn, H.S., and Byers, T. (1993). Recreational physical activity and ten-year weight change in a US national cohort. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* *17*, 279–286.
- Wilson, M.S., Madala, S.K., Ramalingam, T.R., Gochuico, B.R., Rosas, I.O., Cheever, A.W., and Wynn, T.A. (2010). Bleomycin and IL-1 $\beta$ -mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. *J. Exp. Med.* *207*, 535–552.
- Wilson, N.J., Boniface, K., Chan, J.R., McKenzie, B.S., Blumenschein, W.M., Mattson, J.D., Basham, B., Smith, K., Chen, T., Morel, F., et al. (2007). Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat. Immunol.* *8*, 950–957.
- Winer, D.A., Winer, S., Shen, L., Wadia, P.P., Yantha, J., Paltser, G., Tsui, H., Wu, P., Davidson, M.G., Alonso, M.N., et al. (2011). B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. *Nat. Med.* *17*, 610–617.
- Winer, D.A., Luck, H., Tsai, S., and Winer, S. (2016). The Intestinal Immune System in Obesity and Insulin Resistance. *Cell Metab.* *23*, 413–426.
- Winer, S., Chan, Y., Paltser, G., Truong, D., Tsui, H., Bahrami, J., Dorfman, R., Wang, Y., Zielenski, J., Mastronardi, F., et al. (2009a). Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat. Med.* *15*, 921–929.
- Winer, S., Paltser, G., Chan, Y., Tsui, H., Engleman, E., Winer, D., and Dosch, H.-M. (2009b). Obesity predisposes to Th17 bias. *Eur. J. Immunol.* *39*, 2629–2635.
- Wing, R.R., and Hill, J.O. (2001). Successful weight loss maintenance. *Annu. Rev. Nutr.* *21*, 323–341.
- Wong, A.L., Haroon, Z.A., Werner, S., Dewhirst, M.W., Greenberg, C.S., and Peters, K.G. (1997). Tie2 expression and phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circ. Res.* *81*, 567–574.
- Wong, N., Fam, B.C., Cempako, G.R., Steinberg, G.R., Walder, K., Kay, T.W., Proietto, J., and Andrikopoulos, S. (2011). Deficiency in interferon-gamma results in reduced body weight and better glucose tolerance in mice. *Endocrinology* *152*, 3690–3699.
- Wright, E.E., and Simpson, E.R. (1981). Inhibition of the lipolytic action of beta-adrenergic agonists in human adipocytes by alpha-adrenergic agonists. *J. Lipid Res.* *22*, 1265–1270.
- Wu, L., and Liu, Y.-J. (2007). Development of dendritic-cell lineages. *Immunity* *26*, 741–750.
- Wu, D., Molofsky, A.B., Liang, H.-E., Ricardo-Gonzalez, R.R., Jouihan, H.A., Bando, J.K., Chawla, A., and Locksley, R.M. (2011). Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science* *332*, 243–247.
- Wu, L., Parekh, V.V., Gabriel, C.L., Bracy, D.P., Marks-Shulman, P.A., Tamboli, R.A., Kim, S., Mendez-Fernandez, Y.V., Besra, G.S., Lomenick, J.P., et al. (2012). Activation of invariant natural killer T cells by lipid excess promotes tissue inflammation, insulin resistance, and hepatic steatosis in obese mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, E1143–E1152.
- Wu, M., Melichian, D.S., Chang, E., Warner-Blankenship, M., Ghosh, A.K., and Varga, J. (2009). Rosiglitazone abrogates bleomycin-induced scleroderma and blocks profibrotic responses through peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Am. J. Pathol.* *174*, 519–533.

- Wu, Z., Rosen, E.D., Brun, R., Hauser, S., Adelmant, G., Troy, A.E., McKeon, C., Darlington, G.J., and Spiegelman, B.M. (1999). Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol. Cell* 3, 151–158.
- Xu, J.-M., and Shi, G.-P. (2012). Emerging role of mast cells and macrophages in cardiovascular and metabolic diseases. *Endocr. Rev.* 33, 71–108.
- Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., et al. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 112, 1821–1830.
- Xue, Y., Lim, S., Bråkenhielm, E., and Cao, Y. (2010). Adipose angiogenesis: quantitative methods to study microvessel growth, regression and remodeling in vivo. *Nat. Protoc.* 5, 912–920.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Yamashita, S., Noda, M., Kita, S., Ueki, K., et al. (2002). Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat. Med.* 8, 1288–1295.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., Sugiyama, T., Miyagishi, M., Hara, K., Tsunoda, M., et al. (2003). Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423, 762–769.
- Yamauchi, T., Nio, Y., Maki, T., Kobayashi, M., Takazawa, T., Iwabu, M., Okada-Iwabu, M., Kawamoto, S., Kubota, N., Kubota, T., et al. (2007). Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat. Med.* 13, 332–339.
- Yang, H., Youm, Y.-H., Vandanmagsar, B., Ravussin, A., Gimble, J.M., Greenway, F., Stephens, J.M., Mynatt, R.L., and Dixit, V.D. (2010). Obesity increases the production of proinflammatory mediators from adipose tissue T cells and compromises TCR repertoire diversity: implications for systemic inflammation and insulin resistance. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 185, 1836–1845.
- Yang, L., Anderson, D.E., Baecher-Allan, C., Hastings, W.D., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V.K., and Hafler, D.A. (2008). IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* 454, 350–352.
- Ye, J., Gao, Z., Yin, J., and He, Q. (2007). Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293, E1118–E1128.
- Yoon, M.J., Lee, G.Y., Chung, J.-J., Ahn, Y.H., Hong, S.H., and Kim, J.B. (2006). Adiponectin increases fatty acid oxidation in skeletal muscle cells by sequential activation of AMP-activated protein kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, and peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Diabetes* 55, 2562–2570.
- Yuan, M., Konstantopoulos, N., Lee, J., Hansen, L., Li, Z.W., Karin, M., and Shoelson, S.E. (2001). Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* 293, 1673–1677.
- Zeng, W., Pirzgalska, R.M., Pereira, M.M.A., Kubasova, N., Barateiro, A., Seixas, E., Lu, Y.-H., Kozlova, A., Voss, H., Martins, G.G., et al. (2015). Sympathetic neuro-adipose connections mediate leptin-driven lipolysis. *Cell* 163, 84–94.

- Zeyda, M., Farmer, D., Todoric, J., Aszmann, O., Speiser, M., Györi, G., Zlabinger, G.J., and Stulnig, T.M. (2007). Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. *Int. J. Obes.* 2005 *31*, 1420–1428.
- Zeyda, M., Huber, J., Prager, G., and Stulnig, T.M. (2011a). Inflammation correlates with markers of T-cell subsets including regulatory T cells in adipose tissue from obese patients. *Obes. Silver Spring Md* *19*, 743–748.
- Zeyda, M., Huber, J., Prager, G., and Stulnig, T.M. (2011b). Inflammation correlates with markers of T-cell subsets including regulatory T cells in adipose tissue from obese patients. *Obes. Silver Spring Md* *19*, 743–748.
- Zhang, N., and Bevan, M.J. (2011). CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity* *35*, 161–168.
- Zhang, Q.X., Magovern, C.J., Mack, C.A., Budenbender, K.T., Ko, W., and Rosengart, T.K. (1997). Vascular endothelial growth factor is the major angiogenic factor in omentum: mechanism of the omentum-mediated angiogenesis. *J. Surg. Res.* *67*, 147–154.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* *372*, 425–432.
- Zhao, R., Tang, D., Yi, S., Li, W., Wu, C., Lu, Y., Hou, X., Song, J., Lin, P., Chen, L., et al. (2014). Elevated peripheral frequencies of Th22 cells: a novel potent participant in obesity and type 2 diabetes. *PloS One* *9*, e85770.
- Zheng, C., Yang, Q., Cao, J., Xie, N., Liu, K., Shou, P., Qian, F., Wang, Y., and Shi, Y. (2016). Local proliferation initiates macrophage accumulation in adipose tissue during obesity. *Cell Death Dis.* *7*, e2167.
- Zhu, J., and Paul, W.E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* *112*, 1557–1569.
- Zhu, L., Su, T., Xu, M., Xu, Y., Li, M., Wang, T., Sun, J., Zhang, J., Xu, B., Lu, J., et al. (2013). Eosinophil inversely associates with type 2 diabetes and insulin resistance in Chinese adults. *PloS One* *8*, e67613.
- Ziccardi, P., Nappo, F., Giugliano, G., Esposito, K., Marfella, R., Cioffi, M., D’Andrea, F., Molinari, A.M., and Giugliano, D. (2002). Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. *Circulation* *105*, 804–809.
- Ziemke, F., and Mantzoros, C.S. (2010). Adiponectin in insulin resistance: lessons from translational research. *Am. J. Clin. Nutr.* *91*, 258S – 261S.
- Zúñiga, L.A., Shen, W.-J., Joyce-Shaikh, B., Pyatnova, E.A., Richards, A.G., Thom, C., Andrade, S.M., Cua, D.J., Kraemer, F.B., and Butcher, E.C. (2010). IL-17 regulates adipogenesis, glucose homeostasis, and obesity. *J. Immunol. Baltim. Md* *185*, 6947–6959.



### **Inflammation du tissu adipeux au cours de l'obésité humaine : implication des Th17**

Une série d'études récentes chez l'homme et dans les modèles murins a conduit à la mise en évidence d'une réponse immune, qui met en jeu des cellules de l'immunité innée et de l'immunité adaptative dans le tissu adipeux (TA) obèse.

Nous avons mis en évidence un dialogue pro-inflammatoire entre les macrophages et les LT CD4<sup>+</sup> dans le TA humain obèse mettant en jeu l'IL-1 $\beta$ , l'IL-17 et l'IL-22. Le pourcentage de Th17 est positivement corrélé au % d'HbA1c. De plus, la sécrétion des cytokines impliquées dans cette boucle pro-inflammatoire diminuent après une perte de poids induite par la chirurgie bariatrique.

Par la suite, nous avons montré que l'IL-1 $\beta$  et l'IL-17 induisent des programmes transcriptionnels pro-inflammatoires concordant dans trois types de cellules non-immunitaires du TA, les pré-adipocytes, les cellules endothéliales et les adipocytes, et diminuent les gènes du métabolisme dans les adipocytes. Les effets d'IL-1 $\beta$  sont nettement plus prononcés que ceux de l'IL-17. Le milieu conditionné de cellules immunitaires CD45<sup>+</sup> reproduit les réponses pro-inflammatoire et catabolique induites par les cytokines recombinantes dans les adipocytes, et ces réponses sont inhibées après la neutralisation de l'IL-17 et l'IL-1 $\beta$ .

Ces résultats démontrent une implication pathologique de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-17 dans les altérations du TA induites par l'obésité.

**Mots clés :** obésité, tissu adipeux, Th17, IL-1 $\beta$ , cellules non-immunitaires, inflammation, métabolisme

### **Adipose tissue inflammation during human obesity: involvement of Th17 cells**

A series of recent studies in humans and mouse models has led to the detection of an immune response, which involves cells of the innate immunity and adaptive immunity in obese adipose tissue (AT).

We highlighted a proinflammatory crosstalk between macrophages and CD4<sup>+</sup> T cells in obese human AT involving IL-1 $\beta$ , IL-17 and IL-22. Percentage of Th17 is positively correlated with HbA1c %. Moreover, the secretion of the cytokines implicated in this proinflammatory loop decreased after weight loss induced by bariatric surgery.

Subsequently, we have shown that IL-1 $\beta$  and IL-17 induce proinflammatory transcriptional programs in three types of non-immune cells of the TA, preadipocytes, endothelial cells and adipocytes, and decrease metabolism genes in adipocytes. IL-1 $\beta$  effects are much more pronounced than those of IL-17. The conditioned medium of CD45<sup>+</sup> immune cells reproduces the pro-inflammatory and catabolic responses induced by the recombinant cytokines in adipocytes, and these responses are inhibited after the neutralization of IL-17 and IL-1 $\beta$ .

These results demonstrate a pathological involvement of IL-1 $\beta$  and IL-17 in the AT dysfunction induced by obesity.

**Keywords:** obesity, adipose tissue, Th17, IL-1 $\beta$ , non-immunes cells, inflammation, metabolism